



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

LICENCIATURA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

# **“Preparación y Caracterización de Películas de Quitosano Modificadas con Nanocristales de Celulosa”**

Flavia A. Corsello

Director: Dr. Pablo J. Peruzzo

Co-director: Dr. Javier I. Amalvy





UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

---

“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
PELÍCULAS DE QUITOSANO  
MODIFICADAS CON NANOCRISTALES DE CELULOSA”

---

Flavia A. Corsello

Director: Dr. Pablo J. Peruzzo

Co-director: Dr. Javier I. Amalvy

La Plata, diciembre de 2015.-

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), para obtener el grado académico de Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos, bajo la dirección del Dr. Pablo José Peruzzo y la co-dirección del Dr. Javier Ignacio Amalvy.

## **AGRADECIMIENTOS**

En la realización de este trabajo culmina para mí un trayecto recorrido, el cual no hubiera sido posible sin instituciones y personas que me acompañaron, a las que quiero mencionar en forma de agradecimiento:

*A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas, por brindarme de forma gratuita las herramientas necesarias para el desarrollo de mis estudios. A todos aquellos profesores, que me enseñaron con dedicación. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por la financiación de este trabajo.*

*A mi director, Pablo, por guiarme en la realización de este trabajo con vocación, por el valioso tiempo dedicado tanto en el laboratorio como durante la redacción, por trasmitirme siempre confianza y optimismo.*

*A mi codirector, Javier, por recibirme cordialmente en su grupo de trabajo y brindarme confianza para que desarrolle las actividades experimentales con libertad.*

*A mis compañeros en mi paso por el INIFTA, por hacerme sentir parte de sus grupos de trabajo, por la buena predisposición a ayudarme, por los mates y la buena onda.*

*A mi familia, por el amor y apoyo incondicional. En especial a mi mamá y a mi papá, por darme la posibilidad de elegir y por sus esfuerzos para que pueda realizar mis estudios universitarios lejos de casa. A mis hermanas y a mi hermano, por el apoyo mutuo y crecer siempre a la par.*

*A mis amigos, por el aguante. Por confiar en mí y alentarme siempre para seguir adelante. Por estar para compartir alegrías y dividir tristezas.*

*A mis compañeros de la facultad, por hacer más ameno el camino cuando iba cuestas arriba y por tantas experiencias compartidas que me guardo para siempre.*

## **RESUMEN**

Este trabajo presenta la preparación de películas de quitosano reforzadas con diferente contenido de nanocelulosa cristalina (1, 3, 5, 10 %p/p), donde la preparación de composición 3%p/p de CNC fue evaluada también en presencia de glicerol al 5 y 10 %p/p. Las películas fueron obtenidas por el método de "casting" a partir de dispersiones preparadas por combinación de una solución acuosa de ácido acético al 1%p/v con una dispersión acuosa de nanocristales de celulosa.

Con el objeto de conocer las propiedades de los materiales compuestos preparados y valorar su potencial aplicación en el área de envases alimentarios, se realizaron ensayos de caracterización pertinentes: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia UV-Visible; Microscopía de barrido electrónico (SEM); Ángulo de contacto; Calorimetría diferencial de barrido (DSC); Análisis termogravimétrico (TGA); Absorción de agua; Permeabilidad al vapor de agua; Propiedades mecánicas (Resistencia a la tracción) y Migración global en medio simulante. El trabajo se completó comprobando la actividad antimicrobiana atribuida a las películas nanocompuestas, para lo cual las se estudió el efecto inhibitorio frente a enteropatógenos de películas con y sin tratamientos de neutralización durante el proceso de obtención.

## ÍNDICE

### **1. Introducción**

<b>1.1-</b> Envases de alimentos.....	Pág.1
<b>1.2-</b> Envases biodegradables y sustentables.....	Pág.3
<b>1.3-</b> Polímeros biodegradables: Quitosano.....	Pág.4
<b>1.4-</b> Nanocompuestos poliméricos: Quitosano/Nanocristales de Celulosa.....	Pág.5

### **2. Objetivos**

<b>2.1-</b> Objetivo general.....	Pág.10
<b>2.2-</b> Objetivos particulares.....	Pág.10

### **3. Materiales y métodos**

<b>3.1-</b> Materiales.....	Pág.12
<b>3.2-</b> Obtención de películas.....	Pág.12
<b>3.2.1-</b> Optimización de la obtención de películas de quitosano.....	Pág.12
<b>3.2.2-</b> Optimización de la obtención de dispersiones de nanocristales de celulosa.....	Pág.13
<b>3.2.3-</b> Obtención de materiales compuestos quitosano-nanocristales de celulosa.....	Pág.14
<b>3.3-</b> Caracterización de películas.....	Pág.15
<b>3.3.1-</b> Espesor.....	Pág.15
<b>3.3.2-</b> Espectroscopia UV-Visible.....	Pág.15
<b>3.3.3-</b> Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	Pág.16
<b>3.3.4-</b> Microscopía de barrido electrónico (SEM).....	Pág.16
<b>3.3.5-</b> Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	Pág.16
<b>3.3.6-</b> Análisis Termogravimétrico (TGA).....	Pág.17
<b>3.3.7-</b> Absorción de agua.....	Pág.17
<b>3.3.8-</b> Ángulo de contacto.....	Pág.18
<b>3.3.9-</b> Permeabilidad al vapor de agua (WVP).....	Pág.18
<b>3.3.10-</b> Propiedades mecánicas (Resistencia a la tracción).....	Pág.19
<b>3.3.11-</b> Ensayo de migración global.....	Pág.20
<b>3.3.12-</b> Estudio del efecto inhibitorio de las películas frente a <i>Escherichia Coli</i> ATCC y <i>Shigella flexneri</i> ATCC.....	Pág.23

#### **4. Resultados y discusión**

<b>4.1-</b> Optimización de la obtención de películas de quitosano.....	Pág.25
<b>4.2-</b> Dispersiones de nanocristales de celulosa.....	Pág.27
<b>4.2.1-</b> Preparación de dispersiones acuosas de CN.....	Pág.27
<b>4.2.2-</b> Ensayo de sonicación de una dispersión de CN al 1% p/v en solución acuosa de ácido acético .....	Pág.28
<b>4.3-</b> Caracterización de películas nanocompuestas.....	Pág.30
<b>4.3.1-</b> Obtención de películas Q-CN y Q-CN-G.....	Pág.30
<b>4.3.2-</b> Espectroscopia UV-Visible.....	Pág.30
<b>4.3.3-</b> Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	Pág.31
<b>4.3.4-</b> Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	Pág.34
<b>4.3.5-</b> Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	Pág.36
<b>4.3.6-</b> Análisis termogravimétrico (TGA).....	Pág.38
<b>4.3.7-</b> Absorción de agua.....	Pág.39
<b>4.3.8-</b> Ángulo de contacto.....	Pág.41
<b>4.3.9-</b> Permeabilidad al vapor de agua (WVP) .....	Pág.42
<b>4.3.10-</b> Propiedades mecánicas.....	Pág.43
<b>4.3.11-</b> Migración global.....	Pág.45
<b>4.3.12-</b> Estudio de los efectos inhibitorios de las películas sobre E. coli y S. flexneri.....	Pág.48
<b>5. Conclusiones</b> .....	Pág.52
<b>6. Referencias bibliográficas</b> .....	Pág.52



**1.**

# **Introducción**





## 1- INTRODUCCIÓN

### 1.1- Envases de alimentos

Los envases en la actualidad integran parte de las tecnologías de preservación de los alimentos, necesarias para protegerlos de cualquier tipo de deterioro durante su almacenamiento y distribución y prolongar su vida útil. Al mismo tiempo, el envasado permite la diferenciación en el mercado, la comercialización del producto, y educa e informa al consumidor.

Las exigencias en las características de los materiales destinados a ser aplicados como envases alimentarios se deben a la necesidad de mantener la calidad e inocuidad de los alimentos y a la vez producir un mínimo impacto negativo al medio ambiente al término de su ciclo de vida [Arrieta y col., 2015].

La resolución MERCOSUR GMC Nº 36/93 define tres tipos de envases, según su proximidad con el alimento:

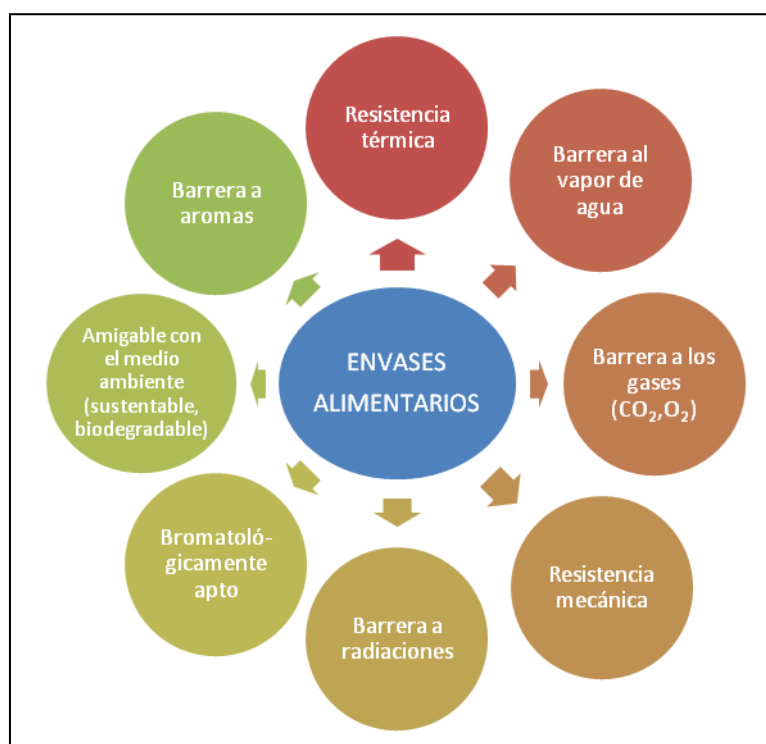
- ❖ Envase primario, envoltura primaria o recipiente: es el envase que se encuentra en contacto directo con los alimentos.
- ❖ Envase secundario o empaque: es el envase destinado a contener el o los envases primarios.
- ❖ Envase terciario o embalaje: es el envase destinado a contener uno o varios envases secundarios.

El Código Alimentario Argentino, en su Capítulo IV, reconoce una gama de materiales para la confección de envases y los clasifica en diferentes categorías, existiendo resoluciones específicas para cada caso; normativas que detallan las disposiciones generales, listas positivas - enumeraciones concretas de los materiales autorizados- y métodos de ensayos requeridos según el material a utilizar. Dichas categorías son:

- Materias plásticas, incluidos los barnices y los revestimientos;
- Celulosas regeneradas;
- Elastómeros y cauchos;
- Papeles y cartones;
- Cerámicas;
- Vidrio;
- Metales y Aleaciones;
- Madera, incluido el corcho;
- Productos textiles;
- Ceras de parafinas y ceras microcristalinas;
- Otros.

De la lista mencionada, los cuatro primeros son los materiales de mayor importancia respecto a su volumen de uso. Sin embargo, una serie de características atractivas de los plásticos -polímeros que pueden moldearse por temperatura y presión- como la baja densidad, flexibilidad, transparencia u opacidad, inercia química, resistencia, versatilidad de formas, bajo costo de materias primas, termosellables, etc., frente a los materiales clásicos, han centrado el interés de la industria del envase y embalaje favoreciendo el incremento de su empleo, y por ende, su consumo [Silvestre y col., 2011].

Los principales plásticos utilizados para la fabricación de envases son polímeros sintéticos provenientes de la industria petroquímica, entre los cuales se pueden mencionar el polietileno (PE), polipropileno (PP), Polietileno tereftalato (PET), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), etc. [CAIP]. Modificando el tipo y composición de polímero, variando el grosor del material, entre otras, se puede obtener una amplia variedad de materiales plásticos, siendo posible la exploración de características que los harán más o menos adecuados para alguna aplicación en particular. En la **Figura 1.1** se resumen las propiedades generales requeridas para los materiales utilizados como envases de alimentos.



**Figura 1.1-** Propiedades generales requeridas para los materiales utilizados como envases de alimentos

Si bien los envases plásticos, en general, despliegan buenas propiedades de barrera frente al calor, la humedad, los gases, etc., facilitan y garantizan el almacenamiento y transporte de los

alimentos en condiciones higiénico-sanitarias apropiadas, presentan inconvenientes que ponen en tela de juicio su aplicación indiscriminada:

- Fenómenos de migración de componentes de bajo peso molecular del envase hacia el alimento, con consecuentes alteraciones organolépticas y posibles efectos tóxicos.
- Permanencia en el ecosistema de los residuos plásticos; dada su baja reactividad química permanecen inalterables por largos períodos de tiempo, lo cual los convierte en una amenaza para el medio ambiente [Marjadi y Dharaia, 2011].
- Las materias primas a partir de las cuales son sintetizados provienen de un recurso natural no renovable, el petróleo, por lo que su producción se ve afectada debido a que comienzan a escasear las reservas [ASPO].

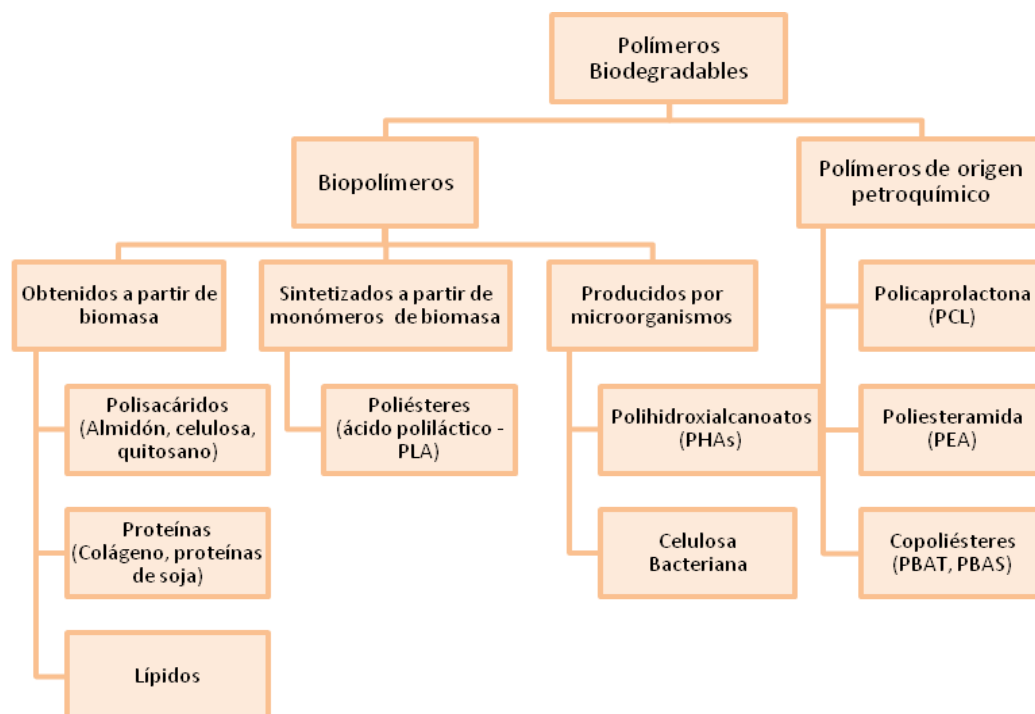
Las problemáticas mencionadas han estimulado la investigación y el desarrollo de nuevos materiales provenientes de fuentes naturales renovables y que sean biodegradables, capaces de reducir significativamente el impacto ambiental en términos de consumo de energía y generación de residuos después de su utilización [Domínguez-Courtney y Jiménez-Munguía, 2012; Pereda y col., 2014; Sorrentino y col., 2007; Zhang y Mittal, 2010].

## **1.2- Envases biodegradables y sustentables**

Dentro de las alternativas en estudio para continuar con la producción masiva de polímeros y promover un desarrollo amigable con el medio ambiente, se encuentran los siguientes materiales:

- ❖ **Biopolímeros;** polímeros derivados de biomasa la cual puede ser extraída directamente de organismos vivos, principalmente plantas (almidón, celulosa y derivados) y animales (colágeno, quitosano), ser producidos por síntesis químicas tradicionales a partir de monómeros bioderivados (polilactato, PLA) o ser producidos por microorganismos ó por bacterias genéticamente modificadas (por ejemplo los polihidroxialcanoatos, PHAs). Los biopolímeros no son necesariamente biodegradables [Fabra y col., 2014].
- ❖ **Polímeros biodegradables;** polímeros derivados de biomasa o petróleo que son biodegradados por microorganismos dando como productos energía, biomasa, agua y dióxido de carbono o metano, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno [Avella y col., 2005].

En la **Figura 1.2** pueden visualizarse algunos ejemplos de esta clasificación.



**Figura 1.2-** Clasificación de los polímeros biodegradables

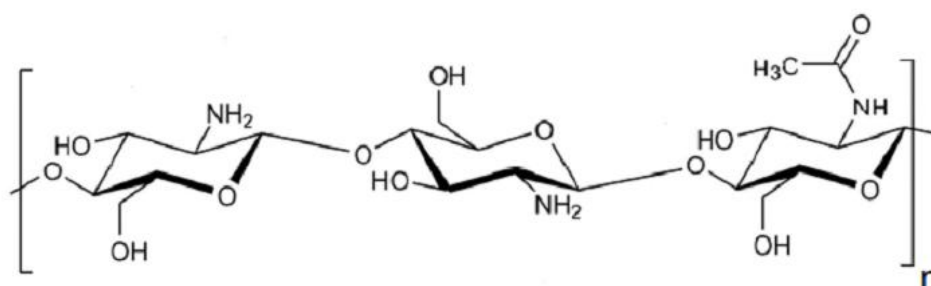
Los biopolímeros obtenidos a partir de fuentes renovables se encuadran dentro de los llamados materiales **sustentables**. El hecho de que un material se obtenga a partir de recursos renovables, no significa que sea biodegradable y viceversa. Es por esto que la combinación de ambas características representa un desafío para la ciencia y tecnología de los materiales. Por otro lado los biopolímeros, en general, presentan propiedades mecánicas débiles, baja resistencia térmica y altas permeabilidades al vapor de agua, lo que han limitado fuertemente sus aplicaciones como envases de alimentos [Sorrentino y col., 2007]. En este sentido, el reto está en lograr que su comportamiento se asemeje al de los materiales plásticos tradicionales. Recientemente, el desarrollo de **nanocompuestos poliméricos**, los cuales consisten en una matriz de polímero reforzada con nanopartículas, es considerado una opción prometedora para la mejora de las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera que presentan los materiales basados en polímeros [Rhim J.W. y col., 2013].

### **1.3- Polímeros biodegradables: Quitosano**

El quitosano es un biopolímero con un gran potencial, utilizado en una amplia gama de aplicaciones ya que posee propiedades biológicas únicas, entre las que se incluyen su biocompatibilidad, su biodegradabilidad, su marcada actividad antibacteriana, entre otras, permitiendo por ejemplo el desarrollo de andamios (*scaffolds*) para ingeniería de tejidos en una gran variedad de formas, como polvos, micropartículas y películas. El quitosano es una

macromolécula que se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, que es el segundo mayor polisacárido en abundancia después de la celulosa. La quitina se encuentra principalmente como un elemento estructural en el exoesqueleto de los crustáceos (cangrejos, gambas, langostas, etc). El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (**Figura 1.3**). Según Rinaudo [Rinaudo, 2006] las unidades acetiladas pueden estar formando bloques, debido a la presencia de zonas donde no pudo reaccionar el NaOH con la quitina (zonas más cristalinas, rodillos rígidos, etc). Recientemente también se ha obtenido quitosano a partir de la quitina presente en la pluma de calamar [Berghoff, 2011]. Dado que éstos son desechos de la industria pesquera, tendríamos una doble función; reducir el impacto negativo ambiental y valorizar un subproducto sin mayor aprovechamiento, para obtener un producto de origen biológico con alto costo en el mercado.

A diferencia de los polímeros sintéticos, este polímero no presenta limitaciones en cuanto a la biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad, además de ser naturalmente abundante y renovable. El quitosano puede considerarse como un nuevo tipo de material polimérico biofuncional que es ambientalmente benigno [Kurita y col., 2000].



**Figura 1.3-** Estructura química del quitosano

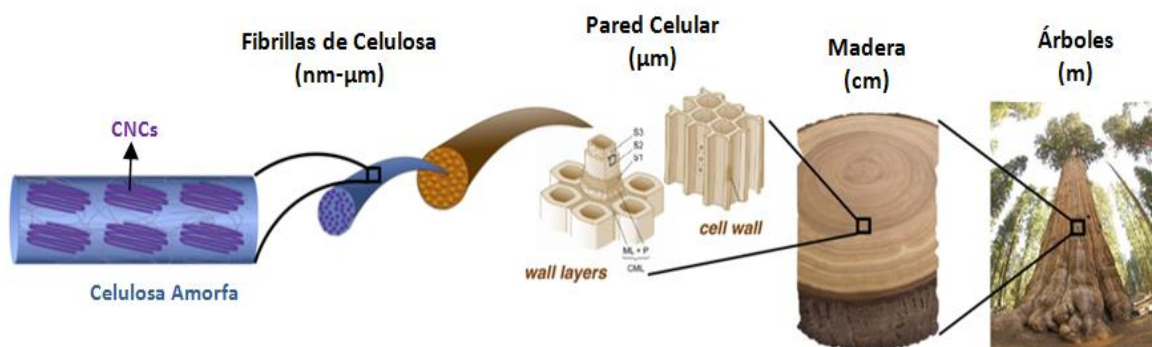
#### **1.4- Nanocompuestos poliméricos: Quitosano/Nanocristales de Celulosa**

Si bien los productos obtenidos a partir de quitosano han encontrado un gran número de aplicaciones industriales en diversas áreas, presentan al igual que muchos otros biopolímeros, propiedades mecánicas y las relacionadas con la absorción de agua inferiores a las de los productos tradicionales. Por tal motivo, el desarrollo de materiales a partir de este polímero ha sido continuo, derivando en el estudio de la incorporación de otros materiales (orgánicos o inorgánicos) a los sistemas de quitosano, en un intento por combinar las características de los materiales de origen, explorar posibles sinergias entre ellas y/o acceder a nuevas propiedades que respondan a las demandas requeridas por la industria del envasado.

Un material polimérico compuesto está definido por una matriz -formada por un polímero- y fibras o rellenos que constituyen el refuerzo. En los últimos años ha habido un interés creciente en el uso de partículas o materiales inorgánicos como cargas o refuerzo de polímeros. Las propiedades de estos nuevos materiales compuestos difieren generalmente en forma marcada de las de los materiales de partida. Sin embargo, el uso potencial de estos refuerzos se ha visto frenado por la frecuente incompatibilidad de los componentes. Para mejorar esa compatibilidad se ha trabajado en la modificación química de las partículas o en el agregado de agentes de acoplamiento (por ejemplo derivados del silano) y así mejorar la dispersión de los materiales, y mejorar por ejemplo la resistencia a la humedad y a la abrasión.

Con el impulso que cobró la *Nanotecnología* en los últimos años, la síntesis y estudio de materiales con dimensiones en la escala del nanómetro se volvió muy popular en muchos campos de la ciencia, y los materiales poliméricos no fueron ajenos a esta tendencia. En este contexto, un **nanocompuesto polimérico** es un sistema compuesto por un material polimérico (termoestable, termoplástico o elastomérico) y de otro material que tiene al menos una dimensión en el rango de la nanoescala (nanopartículas, nanofases, nanohilos, etc.), y que puede ser también un polímero. Referirse sólo al tamaño para caracterizarlos conduciría a una visión incompleta y parcial de estos sistemas ya que además presentan propiedades inusuales muy diferentes a las que conocemos en la macroescala y en general mejoradas en diversos aspectos tales como las propiedades mecánicas, la capacidad de barrera a gases, la estabilidad térmica, la resistencia al fuego entre otras[Koo, 2006].

Un material de nanorefuerzo que ha ganado una particular atención durante los últimos años son los **nanocristales de celulosa** (Cellulose nanocrystals, CN), no sólo por sus propiedades físicas y químicas sin igual, sino también debido a su inherente capacidad de renovación y la sostenibilidad, además de su abundancia. La celulosa constituye el recurso más abundante de polímeros renovables disponibles en la actualidad. Como materia prima, es generalmente bien conocido que se ha utilizado en forma de fibras o derivados desde hace casi 150 años para un amplio espectro de productos y materiales en la vida diaria. Lo que no se ha conocido hasta hace relativamente poco es que cuando las fibras de celulosa son sometidas a hidrólisis ácida, producen varillas libres de defectos, en forma de residuos cristalinos como se puede observar en la **Figura 1.4** [Habibi y col., 2010; Peng y col., 2011; Eichhorn, 2011].



**Figura 1.4-** Esquema del origen de los nanocristales de celulosa

Desde la primera publicación relacionada con el uso de los CN como cargas de refuerzo en nanocompuestos a base de poli (estireno-co-acrilato de butilo) [Favier y col., 1995], éstos han captado el interés de muchos investigadores debido a sus atractivas propiedades intrínsecas como su gran área superficial, morfología única, baja densidad, y resistencia mecánica. Además, pueden ser fácilmente modificados (químicamente), además de ser disponibles, renovables y biodegradables. Los CN se han incorporado en una amplia gama de matrices de polímeros, incluyendo polisiloxanos, polisulfonatos, poli (caprolactona), carboximetilcelulosa, poli (alcohol vinílico), poli(acetato de vinilo), epóxidos, polietileno, polipropileno, poli(cloruro de vinilo) y poliuretanos [Habibi y col., 2010; López-Suevos y col., 2010; Dufresne, 2010].

Como en el caso de otros biopolímeros, se ha estudiado la incorporación de CN a la matriz polimérica del quitosano con el objeto de mejorar las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera de las películas obtenidas. Recientemente Khan y colaboradores [Khan y col., 2012] prepararon películas basadas en quitosano reforzado con CN, variando el contenido de estos entre el 1 y el 10 %p/p. Encontraron una mejora de la resistencia a la tracción en las películas conteniendo 5% de CN en comparación con el quitosano puro. La incorporación de CN también mejoró significativamente las propiedades de barrera y las películas compuestas mostraron una disminución de la absorción de agua.

Por otra parte, también se ha evaluado el efecto de la concentración del nanorefuerzo (CN) y del plastificante (glicerol) sobre las propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad al vapor de agua en películas de quitosano. Los plastificantes se incluyen en las formulaciones con el fin de ayudar a mantener la integridad de las películas, ya que reducen su fragilidad, aumentando la flexibilidad y la resistencia a la ruptura. Los requerimientos básicos para un plastificante en un sistema polimérico son su compatibilidad con el polímero formador de la matriz y su permanencia dentro de la estructura resultante. Al adicionarse a la formulación, los plastificantes se asocian fisicoquímicamente con el polímero, reduciendo la cohesión de la estructura, interfieren en la asociación de las cadenas poliméricas, facilitan su deslizamiento, por lo que aumentan la

flexibilidad de las películas. Ejemplos de plastificantes de grado alimentario son los polialcoholes (glicerol, sorbitol, manitol, sacarosa, propilenglicol y polietilenglicol), siendo el agua el plastificante más común [López, 2012]. En este sentido, Azeredo y colaboradores [Azeredo y col., 2010] encontraron que la mayoría de las propiedades se vieron favorecidas por altas concentraciones de CN y bajo contenido de Glicerol (condiciones óptimas: glicerol 18g/100g; CN 15g/100g), con una mejora en las propiedades de barrera, térmicas y de permeabilidad al vapor de agua. Dehnad y colaboradores [Dehnad y col., 2014] también prepararon materiales compuestos quitosano-nanocelulosa, obteniendo como resultado películas con propiedades mecánicas mejoradas y con valores de permeabilidad al vapor de agua menores a los obtenidos para el quitosano puro. Sus resultados también demostraron como la solubilidad en agua de las películas compuestas puede ser controlada mediante el ajuste de la cantidad de nanorefuerzo incorporado y la concentración de glicerol.

Sin embargo, la obtención de películas conteniendo a los CN dispersos e incorporados no es fácil de alcanzar. La gran relación de aspecto de estos nanorefuerzos hace difícil su incorporación y la dispersión adecuada. Por otra parte, las propiedades de estos materiales dependen fuertemente de las características del nanorefuerzo empleado. Las propiedades de los CN dependen tanto de la fuente natural de la cual éstos fueron obtenidos, así como del método empleado en su preparación, lo cual tiene un importante impacto sobre la relación de aspecto y la funcionalidad de los nanocristales obtenidos. Esto puede explicar en parte las diferencias halladas en la bibliografía para la variación de las propiedades y las composiciones óptimas reportadas de los materiales compuestos quitosano-CN preparados. En adición, una caracterización dirigida hacia el potencial uso de esos sistemas como materiales de envase se hace también necesaria ya que relativamente pocos trabajos abarcan el estudio de estos sistemas desde su preparación y caracterización morfológica, hasta la caracterización de propiedades vinculadas a su potencial uso.

Por lo tanto existe un interés actual en que materiales basados en quitosano/CN sean continuamente desarrollados y caracterizados, ya que su importancia en la vida cotidiana es significativa. Tales materiales están destinados principalmente a aplicaciones biomédicas y diferentes aplicaciones a corto plazo, como por ejemplo para la producción de materiales para el envasado de alimentos, entre otros. Por tanto, representan una fuerte y emergente respuesta hacia la obtención de materiales de altas prestaciones y amigables con el medio ambiente, apareciendo como una alternativa interesante frente a los polímeros tradicionales.





**2.**

## **Objetivos**



## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo general**

El objetivo general del presente trabajo es preparar y caracterizar películas poliméricas ecológicamente aceptables elaboradas a partir de materias primas renovables y biodegradables. Se buscará contribuir a los estudios realizados sobre sistemas quitosano-nanocristales de celulosa en cuanto a su obtención, caracterización y potencial aplicación en la industria de envases alimenticios.

### **2.2- Objetivos particulares**

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- Elaborar materiales poliméricos compuestos a base de quitosano y nanocristales de celulosa, mediante la incorporación adecuada del material de refuerzo.
- Caracterizar las películas obtenidas, evaluando su morfología, distribución de fases y propiedades de superficie (topografía, rugosidad, hidrofiliidad).
- Caracterizar las películas obtenidas para evaluar su potencial aplicación en la industria de envases alimenticios (permeabilidad al vapor de agua, migración global a medios simulantes, resistencia térmica, propiedades mecánicas)
- Estudiar el efecto que ejercen el contenido, la clase y la vía de incorporación del nanorefuerzo sobre las propiedades de los materiales compuestos obtenidos.



## **3. Materiales y Métodos**



### 3- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1- Materiales

En el presente trabajo se empleó quitosano marca Parafarm con un peso molecular viscosimétrico de 310 KDa y un grado de desacetilación (GD) de 95,2 %. Los nanocristales de celulosa (CN) comerciales fueron provistos por la Universidad de Mayne, los cuales son partículas en forma de varilla de  $7 \pm 2$  nm de diámetro y  $164 \pm 32$  nm de largo, obtenidos a partir de pulpa de celulosa. El glicerol (G), hidróxido de sodio (NaOH) y ácido acético (AcOH) utilizados fueron reactivos de calidad analítica marca Anedra.

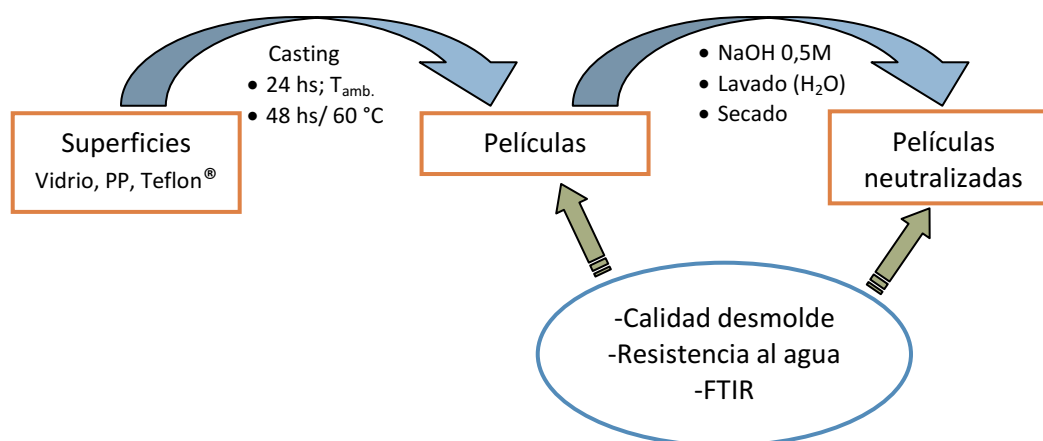
#### 3.2- Obtención de películas

##### 3.2.1- Optimización de la obtención de películas de quitosano

A partir de una solución de quitosano al 2 % p/v en ácido acético al 1 % v/v se obtuvieron películas empleando el método de "*casting*" sobre distintas superficies a fin de evaluar su comportamiento sobre las mismas. Para esto, 25ml de la solución indicada fueron depositados sobre cajas de Petri de vidrio ( $\phi = 10$  cm), sobre cajas de Petri de polipropileno (PP) ( $\phi = 10$  cm) y sobre una superficie de Teflon®. Las soluciones casteadas se mantuvieron durante 24 horas a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) y luego se colocaron en estufa a 60 °C durante 48 horas para lograr la eliminación del solvente.

A continuación, sobre un grupo de muestras, se evaluó la facilidad para despegar las películas de las superficies sobre las que fueron preparadas. En los casos en que fue posible retirar las películas de las superficies ensayadas, las mismas fueron estudiadas por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) empleando la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR). También se evaluó cualitativamente el comportamiento de las películas frente al agua mediante un ensayo de inmersión.

Otro grupo de muestras fueron tratadas, luego del secado y antes del desmolde, con una solución de hidróxido de sodio 0,5 M para su neutralización, y posteriormente fueron lavadas con agua destilada hasta neutralidad del pH del agua de lavado medido con papel indicador. Las películas obtenidas de este modo se dejaron secar a  $T_{amb}$  durante 48 hs sobre una superficie de Teflon® y se caracterizaron por ATR-FTIR como también su comportamiento cualitativo frente al agua. El procedimiento descripto se esquematiza en la **Figura 3.1**.



**Figura 3.1-** Esquema del procedimiento empleado para evaluar la obtención de películas de quitosano sobre distintas superficies.

### 3.2.2- Optimización de la obtención de dispersiones de nanocrisales de celulosa

Las propiedades del nanocompuesto pueden variar dependiendo el grado de interacción entre las nanopartículas y la matriz, por lo que el grado de dispersión de las mismas en la matriz polimérica es un factor importante que afecta a las propiedades del material final. Por esto, es necesaria una adecuada dispersión del nanorefuerzo al momento de su incorporación a la matriz. Con este fin, se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

- 1) *Preparación de dispersiones de CN en agua:* Se obtuvieron dispersiones acuosas con contenido variable de CN (1, 2, 5 y 10 %p/v) empleando agitación magnética. Las características de las mismas se analizaron de manera cualitativa (observación visual).
- 2) *Preparación de dispersión de CN 1 %p/v en solución acuosa de ácido acético empleando sonicador de punta:* La cantidad requerida de CN fue dispersada en 100 ml de ácido acético al 1 % v/v durante 30 minutos mediante agitación magnética y posteriormente se dispersó utilizando un sonicador de punta Scientz JY92-IIN (tip  $\phi=6\ 1/4"$ ; frecuencia 20 kHz, Potencia 80%). Para optimizar la duración de este proceso, se tomaron muestras a intervalos de 5 minutos y se adquirieron sus espectros UV-Vis empleando un equipo Fluorat-02 PANORAMA entre 200 y 800 nm. Tanto la dispersión inicial y final fueron analizadas por microscopia electrónica de transmisión (TEM) para poder observar los cambios producidos durante el sonicado (Microscopio Tecnai G2 Twin; las dispersiones diluidas fueron depositadas sobre grillas de cobre con recubrimiento de carbón y con una película polimérica (Formvar®) de soporte y sin recubrimiento metálico. Para mejorar el contraste se realizó una tinción aplicando sobre las mismas una solución de ácido fosfotúngstico).

### 3.2.3- Obtención de materiales compuestos quitosano-nanocrisales de celulosa

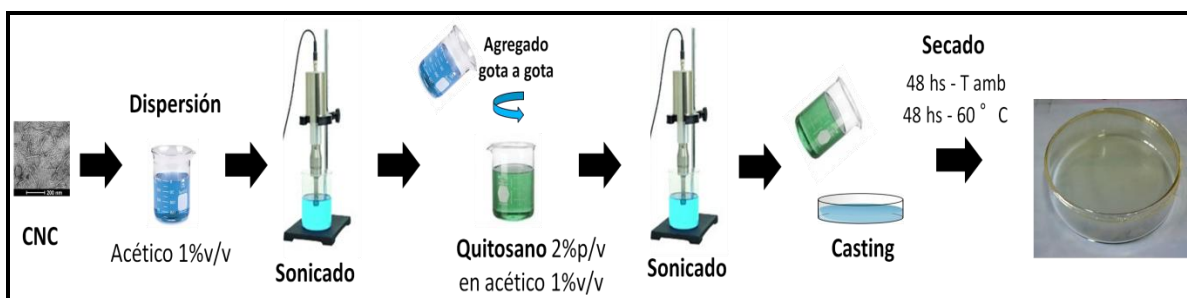
Para la obtención de las películas, se partió de una dispersión de CN al 1% p/v en ácido acético 1% v/v, preparada empleando un sonicador de punta Bandelin Sonopuls HD 60 (tip Titanium TT 12; frecuencia 20 kHz; potencia de salida 37 W) durante 40 minutos. Esta dispersión se adicionó gota a gota y con agitación magnética constante sobre una solución de quitosano al 2 % p/v en ácido acético 1 % v/v (conteniendo o no la cantidad adecuada de glicerol). También se prepararon películas de quitosano, sin agregado del nanorefuerzo, a modo de material de referencia. En la **Tabla 3.1** se especifican las cantidades utilizadas para formar películas de 0,5 gramos y aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  de espesor.

**Tabla 3.1-** Formulación de las películas compuestas preparadas en este trabajo. Las cantidades son las indicadas para preparar películas de 0,5 gramos.

Muestra	Q (%p/p)	CN (%p/p)	G (%p/p)	Q 2 %p/v <sup>1</sup> (ml)	Dispersión de CN		Glicerol (g)
					CN 1 % p/v <sup>1</sup> (ml)	AcOH 1 %v/v (ml)	
Q	100	-	-	25,00	-	-	-
CN1	99	1	-	24,75	0,5	9,5	-
CN3	97	3	-	24,25	1,5	8,5	-
CN5	95	5	-	23,75	2,5	7,5	-
CN10	90	10	-	22,5	5	5	-
CN3-G5	97	3	5	24,25	1,5	8,5	0,025
CN3-G10	97	3	10	24,25	1,5	8,5	0,050

<sup>1</sup> en solución de AcOH 1%v/v

Las mezclas preparadas se sonicaron durante 15 min en las condiciones indicadas anteriormente. Las películas se obtuvieron por el método "*casting*" en cajas de Petri de vidrio ( $\phi = 10$  cm), donde se mantuvieron 48 horas a temperatura ambiente y luego se colocaron en estufa a 60 °C durante 24 horas (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2-** Esquema del protocolo de preparación de películas compuestas Q-CN y Q-CN-G utilizado en este trabajo

Las películas fueron neutralizadas con solución de NaOH al 0,5 M y posteriormente tratadas con agua destilada hasta pH neutro del agua de lavado, permitiendo el desmolde de las mismas. Luego se dejaron secar 48 horas a temperatura ambiente dispuestas sobre una superficie de Teflon® y se reservaron en desecador ( $\text{CaCl}_2$ ) hasta su caracterización. En la **Figura 3.3** se pueden observar imágenes obtenidas durante este procedimiento.



**Figura 3.3-** Imágenes obtenidas durante el procedimiento de neutralización y desmolde de las películas preparadas en este trabajo.

En este trabajo se empleó una notación en la cual Q representa a la muestra de quitosano, mientras que CNX, donde X = 1,3, 5, 10, representa a una muestra con un X contenido porcentual de nanocristales de celulosa en peso. En el caso de las muestras conteniendo glicerol, la nomenclatura empleada fue CN3-GX, donde X=5, 10 representa el contenido porcentual de plastificante en la muestra.

### **3.3- Caracterización de películas**

#### **3.3.1- Espesor**

Para la determinación del espesor de las muestras, se utilizó un medidor de espesores marca Mitutoyo, con una precisión de 0.001 mm. Para todas las muestras se adquirió este parámetro en diferentes puntos de las mismas, informándose el valor de espesor promedio obtenido.

#### **3.3.2- Espectroscopia UV-Visible**

Para el análisis del grado de transparencia de las películas se obtuvieron los espectros UV-Visible utilizando un espectrofotómetro Fluorat-02 PANORAMA. Para ello, películas de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de espesor, se cortaron en rectángulos de 1 cm x 3 cm. Las mismas fueron colocadas en el camino óptico del haz y se realizó un barrido de absorbancia en el rango de longitud de onda de 200 a 800 nm.

### **3.3.3- Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

Esta técnica se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando ésta sea igual a la necesaria para que la molécula comience a vibrar de una determinada manera. Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión involucran cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, mientras que las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. Cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro infrarrojo. De esta forma, analizando cuales son las señales características en una muestra, podemos obtener información acerca de su composición. Por otra parte, en muestras compuestas, los componentes están expuestos a diferentes tipos de interacciones entre sí que pueden repercutir en las características funcionales de los materiales finales. El estudio de estas interacciones también puede abordarse mediante el análisis de los cambios que se producen en las señales características correspondientes a cada componente en el espectro infrarrojo.

Por ello, para estudiar la composición y la estructura de las películas, se adquirieron espectros FTIR de las películas de quitosano y los materiales compuestos obtenidos utilizando un espectrofotómetro FTIR Nicolet 380, empleando el accesorio de Reflectancia Total Atenuada monoreflexión (ATRm). Se adquirieron 64 barridos por experiencia, con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros obtenidos fueron analizados empleando el software EZ-OMNIC.

### **3.3.4- Microscopía de barrido electrónico (SEM)**

La microestructura de las películas de quitosano y de los materiales compuestos fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las imágenes fueron obtenidas empleando un microscopio FEI – Quanta 200 (Holanda), aplicando un voltaje de aceleración de 15 y 20 kV. Se registraron imágenes del corte transversal y de la superficie de las películas con varios aumentos. Las muestras fueron previamente metalizadas con una capa de oro (aprox. 10 nm).

### **3.3.5- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) permite el estudio de aquellos procesos en los que se produce una variación entálpica, por ejemplo determinación de calores específicos, pureza de compuestos cristalinos, entalpías de reacción y determinación de otras transiciones de primer y segundo orden. En general, el DSC puede trabajar en un intervalo de temperaturas que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos



600 °C y permite realizar diferentes tipos de ensayo: dinámico e isoterma. Por esta razón esta técnica de análisis se emplea para caracterizar aquellos materiales que sufren transiciones térmicas en dicho intervalo de temperaturas; la familia de materiales que precisamente presenta todas sus transiciones térmicas en ese intervalo es la de los polímeros.

Dentro de las transiciones térmicas que pueden determinarse en el campo de los polímeros, se destaca la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Esta temperatura corresponde con el paso del polímero de un estado amorfo vítreo (rígido y quebradizo) a un estado gomoso (blando y maleable), y su valor depende de las características estructurales del mismo (simetría, flexibilidad de las cadenas, entrecruzamiento, peso molecular, etc.). Por lo tanto, la  $T_g$  está directamente relacionada con las propiedades mecánicas (resistencia, dureza, fragilidad, elongación) que el polímero presentará a la temperatura a la que se encuentre expuesto.

La técnica más empleada para la medida de  $T_g$  es la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la cual se realizó en este trabajo para algunas muestras seleccionadas. Las curvas DSC fueron obtenidas con un equipo Shimadzu DC-60 (Japón), entre -50 °C y 250 °C, a una velocidad de calentamiento de 10 °C.min<sup>-1</sup>. Las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico antes de realizar las medidas para eliminar la historia térmica mediante un calentamiento inicial de las mismas hasta 150 °C a 10 °C.min<sup>-1</sup>, manteniéndolas a esta temperatura durante 3 minutos, y luego enfriándolas hasta -50 °C a 30 °C.min<sup>-1</sup>. Las muestras (aproximadamente 5 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio con tapa, empleando como referencia 10 mg de alúmina. Las temperaturas a las que ocurre cada transición fueron determinadas empleando el software TA60 versión 2.11.

### **3.3.6- Análisis Termogravimétrico (TGA)**

El análisis de descomposición térmica de algunas muestras seleccionadas se realizó empleando un equipo Shimadzu DTG-60. Para la determinación, aproximadamente 5 mg de muestra fueron colocados en una cápsula de aluminio. Las condiciones empleadas fueron un calentamiento a 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 600°C en atmosfera de N<sub>2</sub>. Las temperaturas a las que ocurrieron las pérdidas de masa, así como la obtención de la derivada de la curva de TGA (dTGA) fueron determinadas empleando el software TA60 versión 2.11.

### **3.3.7- Absorción de agua**

Para realizar los ensayos de absorción de agua, se recortaron círculos de 20 mm de diámetro de cada película (masa  $m_0$ ) y se sumergieron en 15 ml de agua destilada. Luego de su inmersión, las muestras se retiraron, se secaron superficialmente y se pesaron ( $m_t$ ) antes de ser colocadas nuevamente en agua. Inicialmente, las determinaciones se realizaron a intervalos de

tiempo de 2 minutos durante 5 minutos y posteriormente cada 5 minutos hasta completar una hora. El valor final se tomó a las 24 horas de inmersión. El porcentaje de absorción relativo de agua se calculó en base a la **Ec. 3.1**:

$$AA_t \% = \frac{(m_t - m_0)}{m_0} \times 100 \quad (3.1)$$

### 3.3.8- Ángulo de contacto

Para obtener información acerca del grado de hidrofiliicidad/hidrofobicidad de las películas se determinó el ángulo de contacto al agua. Para ello se utilizó un goniómetro ramé-hart Model 500 (**Figura 3.4**) a temperatura ambiente en el modo de ángulo de contacto empleando agua como líquido de prueba (volumen de gota: 10 µl). Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software DROP image Advanced v2.2. Todos los ensayos fueron realizados en la cara aire de las películas obtenidas, adquiriendo al menos seis determinaciones válidas para calcular el valor de ángulo de contacto promedio.



**Figura 3.4-** Goniómetro empleado para la determinación del ángulo de contacto

### 3.3.9- Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

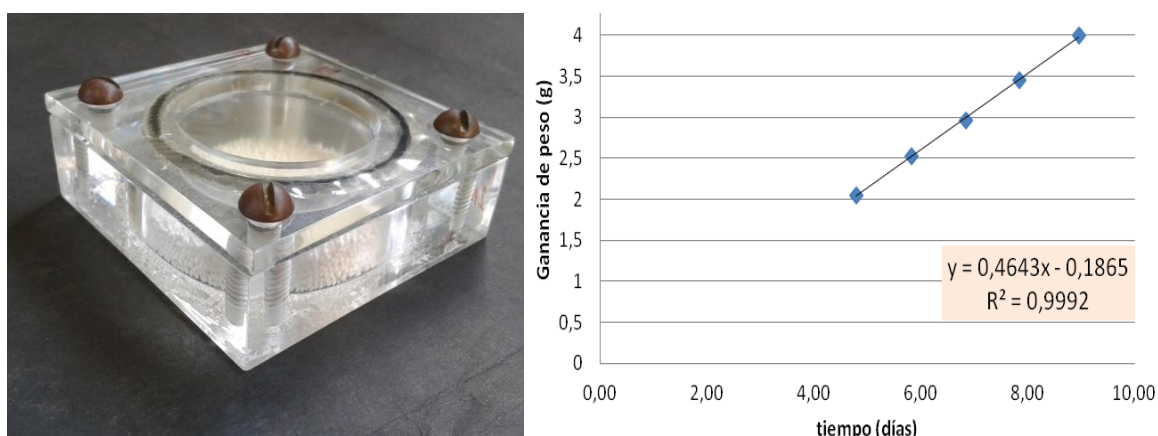
Las propiedades de barrera de los materiales plásticos utilizados en la industria del envasado de alimentos son de especial relevancia, ya que el envase debe proteger al producto de la entrada de oxígeno, humedad, olores y sabores externos, entre otros, con el objetivo de aumentar el tiempo en el que el alimento conserve su calidad tanto organoléptica como sanitaria, es decir, aumentar su vida útil.

En este trabajo se estudió el coeficiente de permeabilidad al vapor de agua de las películas, el cual fue determinado gravimétricamente a 25°C según el método ASTM E96-95. En el interior

de las celdas (**Figura 3.5**) se utilizó como desecante  $\text{CaCl}_2$  (0 % HR). Las celdas fueron colocadas dentro de un desecador manteniendo una humedad relativa de 75 % (solución saturada de NaCl) y una vez alcanzado el equilibrio, fueron pesadas durante siete días. El coeficiente de permeabilidad al vapor de agua (*WVP*) fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{(G/t) \cdot L}{A \cdot P_w \cdot (RH1 - RH2)} \quad (3.2)$$

donde *WVP* está expresado en  $[\text{g} \cdot \text{cm}/(\text{m}^2 \cdot \text{día} \cdot \text{mmHg})]$ ; *G/t* es la ganancia de peso en el estado estacionario  $[\text{g}/\text{d}]$ ; *L* es el espesor promedio de la película  $[\text{cm}]$ ; *A* es el área de permeación  $[\text{m}^2]$ ; (*RH1-RH2*) es la diferencia de humedad relativa entre las dos cámaras de la celda y *P<sub>w</sub>* es la presión parcial del vapor de agua a la temperatura de ensayo  $[\text{mmHg}]$ . El término *G/t* de la ecuación (2) se obtuvo como la pendiente de la línea recta resultante de graficar la ganancia de peso respecto al tiempo en estado estacionario, como se puede observar en la **Figura 3.6**.



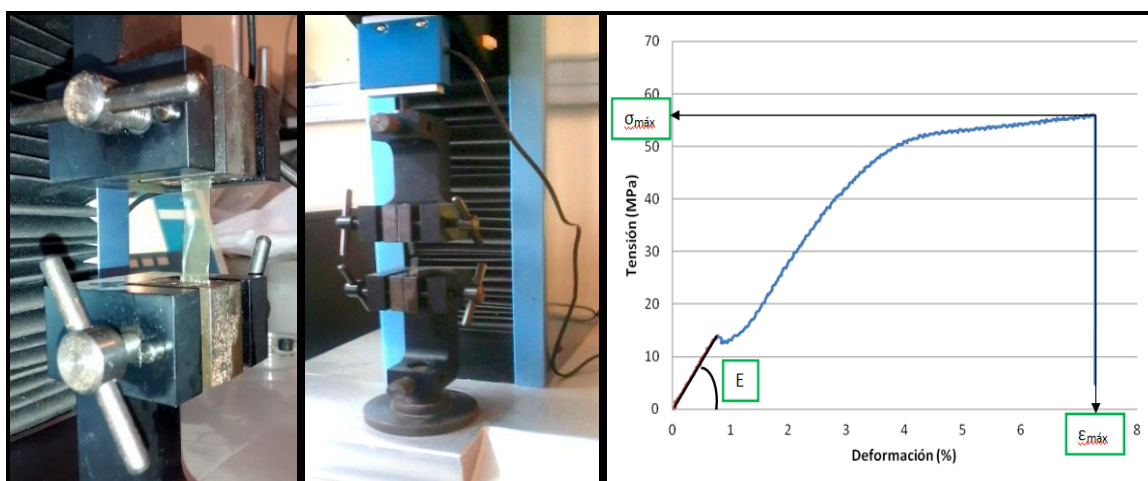
**Figura 3.5-** Celda utilizada en los ensayos de permeabilidad al vapor de agua (izq) y esquema de la obtención del parámetro *G/t* (der).

### 3.3.10- Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas fueron evaluadas mediante el ensayo de resistencia a la tracción, el cual implica la separación a velocidad constante de los extremos de una probeta de película sostenida por mordazas. Se registra en simultáneo la fuerza a la que se somete el material y la resistencia que éste ofrece a la deformación. Las propiedades mecánicas de tracción de las películas obtenidas se realizaron a temperatura ambiente empleando una máquina de ensayos DIGIMESS TC-500 equipada con una celda de carga de 50N. Probetas de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de espesor, 1 cm de ancho y 5 cm de largo fueron sometidas a una velocidad de ensayo de 5 mm/min [ASTM D638]. A partir de las curvas de fuerza(N) vs. distancia(mm) adquiridas por el equipo (TC Capture v2.1.4), se obtuvieron las curvas de tensión( $\sigma$ =fuerza/área transversal de la película) vs. deformación ( $\epsilon\%$ =porcentaje de elongación respecto de la separación inicial de las

mordazas). En base a estas últimas se recolectaron los siguientes parámetros: la tensión en el momento de ruptura ( $\sigma_{\text{máx}}$ ), el porcentaje de deformación al momento de la ruptura ( $\epsilon_{\text{máx}}\%$ ) y el módulo elástico (E). Este último es característico del material y se obtuvo como la pendiente de la recta tangente a la curva *tensión vs. deformación* en su tramo inicial lineal (bajas deformaciones).

Los datos obtenidos fueron el resultado del promedio de al menos cinco determinaciones válidas para cada formulación evaluada. En la **Figura 3.6** se muestra el equipamiento utilizado y una de las curvas resultantes mencionadas a modo de ejemplo.



**Figura 3.6-** Equipo empleado para la determinación de propiedades mecánicas de tracción (izq.) y esquema de los parámetros obtenidos a partir de las curvas tensión vs deformación (der.)

### 3.3.11- Ensayo de migración global

El Código Alimentario Argentino (CAA) en su capítulo IV define al fenómeno de migración como la transferencia de componentes desde el material en contacto con los alimentos hacia dichos productos, debido a procesos fisicoquímicos. Dentro de los ensayos de migración posibles, se encuentra el de *Migración global* que, según indica el CAA, es la cantidad total de componentes transferida desde los materiales en contacto con los alimentos, hacia los alimentos o sus simulantes en las condiciones habituales de empleo, elaboración y almacenamiento, o en las condiciones equivalentes de ensayo. La misma se refiere a la suma de todos los compuestos que migran desde el material plástico hacia el simulante, sin tener en cuenta aspectos toxicológicos, sanitarios u otros.

Para realizar los ensayos de migración, el CAA clasifica los alimentos desde el punto de vista de su interacción con los envases y equipamientos plásticos, y establece los simulantes a utilizar según el tipo de alimento:

Clasificación		Simulante
Tipo I	Alimentos acuosos no ácidos (pH >5)	A <sup>(1)</sup>
Tipo II	Alimentos acuosos ácidos (pH ≤ 5)	B <sup>(2)</sup>
Tipo III a	Alimentos acuosos no ácidos que contienen grasas o aceites.	A, D <sup>(4)</sup>
Tipo III b	Alimentos acuosos ácidos que contienen grasas o aceites.	B, D
Tipo IV	Alimentos grasos	D
Tipo V	Alimentos alcohólicos (contenido de alcohol > 5% v/v)	C <sup>(3)</sup>
Tipo VI	Alimentos secos o de acción extractiva poco significativa.	Ninguno u ocasionalmente A, B, C o D, según el tipo de alimento

<sup>(1)</sup> agua destilada;  
<sup>(2)</sup> solución de ácido acético al 3% (m/v) en agua destilada;  
<sup>(3)</sup> solución de etanol al 15 % (v/v) en agua destilada o solución de etanol en agua destilada a la concentración más próxima a la real;  
<sup>(4)</sup> aceite de oliva refinado

En los ensayos de migración se debe realizar el contacto de los materiales plásticos con los simulantes, en las condiciones de tiempo y temperatura seleccionados de modo de reproducir lo más fielmente posible las condiciones normales o previsibles de elaboración, fraccionamiento, almacenamiento, distribución, comercialización y consumo del alimento (CAA, cap. IV).

En este trabajo, el ensayo se realizó para cada formulación en estudio utilizando 1 dm<sup>2</sup> de área superficial de material. El medio simulante utilizado fue isooctano, como alternativo al aceite de oliva refinado para evitar la absorción de éste por parte de la película, además de facilitar los ensayos analíticos posteriores (FTIR). Las muestras fueron cortadas en películas de sección circular, se pesaron (masa inicial) y se colocaron en un tubo de vidrio en un arreglo que permitió exponer la totalidad del área superficial de las mismas al medio simulante (80 ml), tal como se presenta en la **Figura 3.7**.



**Figura 3.7-** Fotografía de un ensayo de migración global realizado en este trabajo.

Paralelamente se preparó un tubo “blanco de simulante” y, junto con las muestras, se sometió a las condiciones de tiempo y temperatura de ensayo especificadas por el CAA (2 días, 20 °C). Una vez transcurrido el tiempo de ensayo, se retiraron las películas del recipiente y se procedió a determinar la cantidad de residuo transferido desde el material al medio simulante. Por un lado, el isooctano se trasvasó a un frasco previamente tarado y se evaporó lentamente mediante un evaporador rotatorio a presión reducida y posteriormente en tambor de vacío hasta llegar a peso constante. El peso del residuo (R) se obtuvo por la diferencia del peso del frasco antes del ensayo ( $P_1$ ) y del peso del mismo conteniendo el residuo ( $P_2$ ), corrigiendo este valor con el blanco (B) realizado, según la ecuación 3.3:

$$R = P_2 - P_1 - B \quad (3.3)$$

En el caso de observar residuo, los mismos fueron analizados por FTIR. Por otro lado, las películas se llevaron a estufa a 60 °C por 48 hs para evaporar por completo el solvente y luego se pesaron (masa final). La diferencia de peso de las películas antes y después del ensayo, evidencia la transferencia de material de las mismas al medio.

Por último, se calculó el valor de migración global, en mg/Kg o mg/dm<sup>2</sup>, según la ecuación 3.4:

$$MG = (R/A) \cdot (S/V) \quad (3.4)$$

donde MG es la migración global en mg/kg; R la masa del residuo seco en mg; A es el área total de contacto de la muestra con el simulante en dm<sup>2</sup>; y S/V la relación área/masa de agua correspondiente al volumen de contacto real entre el material plástico y el alimento, en dm<sup>2</sup>/kg de agua (cuando el ensayo de migración se efectúa sobre el material polimérico genérico y no sobre el envase final, se usa la relación S/V real. Si esta relación no se conoce, puede usarse una relación S/V = 6 dm<sup>2</sup>/kg).

### **3.3.12- Estudio del efecto inhibitorio de las películas frente a *Escherichia coli* ATCC y *Shigella flexneri* ATCC.**

A fin de evaluar los efectos de los films frente a patógenos intestinales, se estudió la capacidad inhibitoria de las películas de quitosano (Q), y las películas compuestas preparadas en este trabajo frente a dos enteropatógenos *E coli* ATCC y *S. flexneri* ATCC. Las cepas utilizadas son cepas de colección proporcionada por el grupo de microbiología de la Facultad de Cs Exactas UNLP. Para los ensayos, se utilizaron películas neutralizadas y sin neutralizar, las cuales fueron esterilizadas mediante exposición a luz UV durante 30 min. Una fracción de aproximadamente

0,2500 gr de cada película se colocaron en tubos de ensayo que contenían 4,5 ml de caldo nutritivo estéril (Biokard Diagnostic, Beauvais, Francia). Un inóculo proveniente de un cultivo over night que contenía  $1 \times 10^9$  UFC/ml fue diluido de manera de obtener una densidad óptica (DO) equivalente a  $1 \times 10^4$  UFC/ml. Se inocularon los tubos que contenían a las películas y un tubo sin películas, con 500 microlitros de cultivo de *E. coli* ó *S. spp* según corresponda. Para ambos patógenos se utilizaron controles positivos y negativos de crecimiento. Los tubos se llevaron a 37°C durante 4 hs en agitación. Se realizó el recuento de viables mediante la técnica de spot test, antes y después de la incubación. Para ello se realizaron diluciones seriadas en PBS buffer (NaCl 9 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,795 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,114 g/l; pH 7,2-7,4) y se sembraron en agar nutritivo estéril. Las placas sembradas se incubaron 24 hs a 37°C y luego se procedió al recuento de colonias.



## **4. Resultados y Discusión**





## 4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1- Optimización de la obtención de películas de quitosano

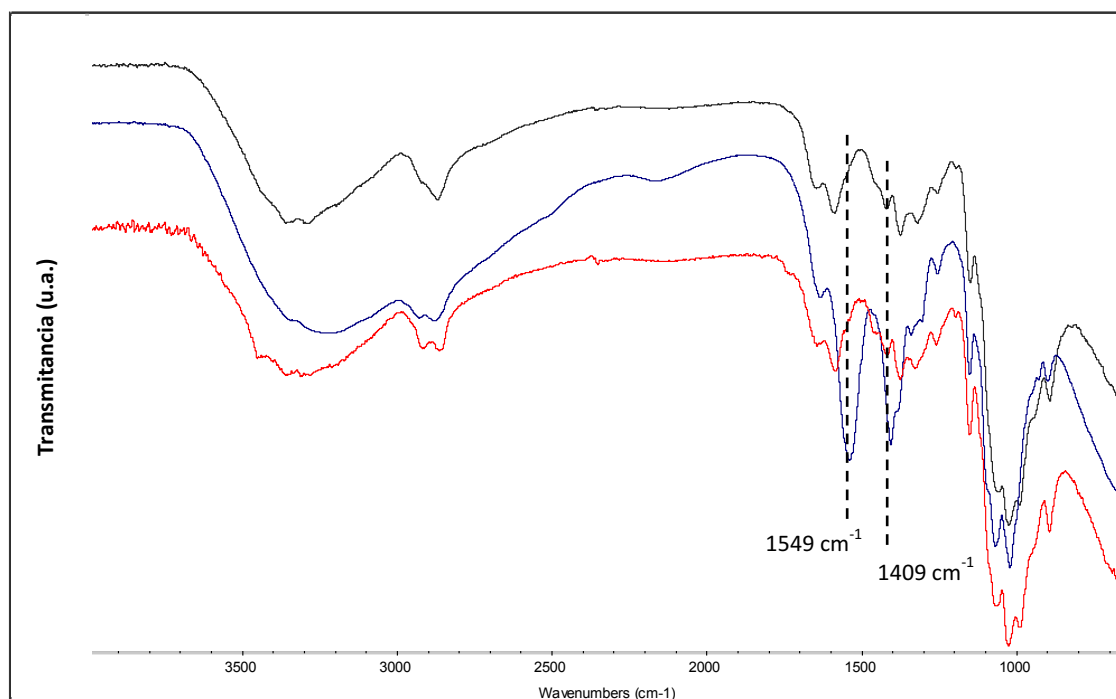
De los ensayos de obtención de películas de quitosano sobre distintas superficies se pudo obtener información relevante para definir el protocolo a seguir para la obtención de las películas a desarrollar en este trabajo.

Luego del *casting*, las películas preparadas sobre superficies de Teflon® y polipropileno se desmoldaron con facilidad, mientras que las películas obtenidas sobre superficie de vidrio no pudieron ser retiradas sin ocasionar daños en las mismas. En todos los casos se pudo apreciar la presencia de ácido acético remanente luego de este procedimiento (olor característico), poniendo en evidencia que el proceso de secado utilizado no es suficiente para eliminar este componente. La presencia de ácido acético fue confirmada por espectroscopia infrarroja. En las **Figuras 4.1 y 4.2** se presentan los espectros ATR-FTIR del quitosano empleado en este trabajo (espectro en negro) y las películas obtenidas por *casting* (espectro en azul), donde efectivamente se observó la presencia de ácido acético (en su forma de sal) en base a las señales  $1549\text{ cm}^{-1}$  y  $1409\text{ cm}^{-1}$ . Al someter estas películas a una inmersión en agua destilada se observó la disolución de las mismas, probablemente a causa de la acidificación del medio debida al ácido acético remanente, el cual incrementa la interacción del agua con las cadenas poliméricas de la matriz, facilitando el hinchamiento de las mismas y su posterior disolución.

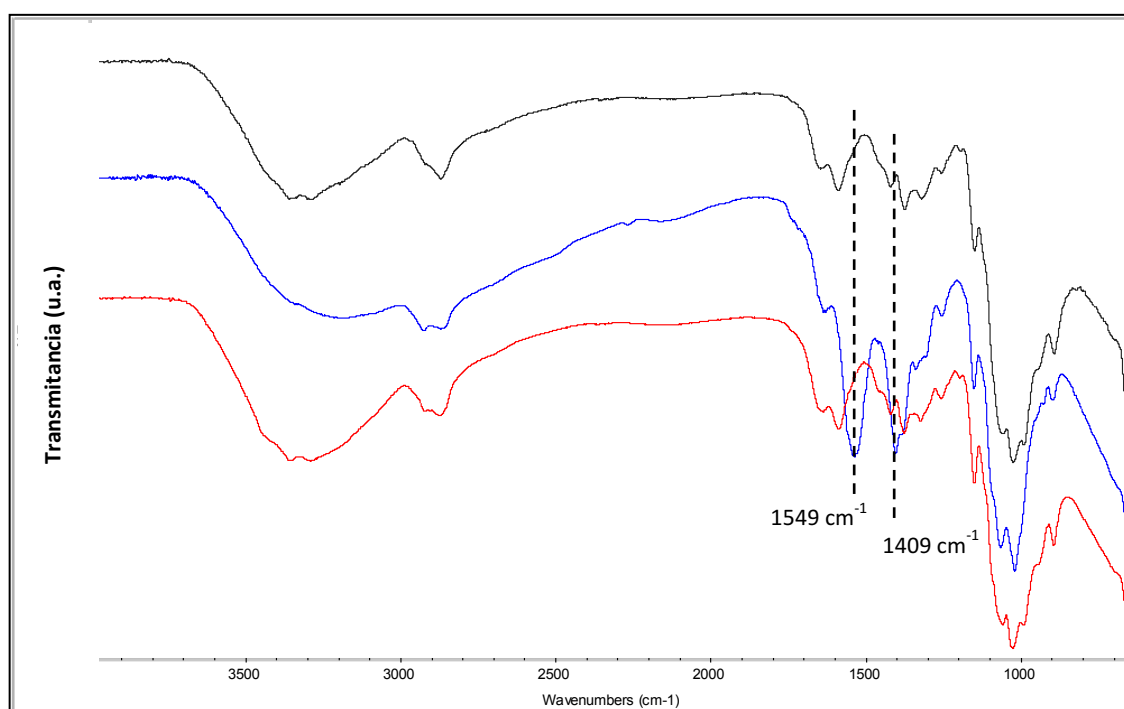
En las películas sometidas a un procedimiento de neutralización, se comprobó la eliminación del ácido acético residual en base a sus espectros ATR-FTIR, como puede observarse en las **Figuras 4.1, 4.2 y 4.3** (espectros en rojo). Los espectros de las películas neutralizadas mostraron ser similares a los espectros del quitosano empleado para su preparación, donde se observó la desaparición de las bandas  $1549\text{ cm}^{-1}$  y  $1409\text{ cm}^{-1}$  asociadas a la presencia del ión acetato. En adición, las películas obtenidas mostraron ser resistentes al agua.

Es importante destacar que las películas obtenidas sobre superficies de vidrio pudieron ser despegadas fácilmente una vez que fueron neutralizadas, sin necesidad de aplicar fuerzas que puedan modificar las dimensiones y estructura interna del material. Por otra parte, se observó que sobre una superficie de Teflon® no se logró extender las soluciones, por lo que no fue posible obtener películas delgadas y de espesor uniforme. En el caso de las cajas de Petri de polipropileno, éstas se deformaron durante el secado en estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ , y por ende no se obtuvieron películas uniformes al no mantenerse el soporte firme durante la formación de las películas.

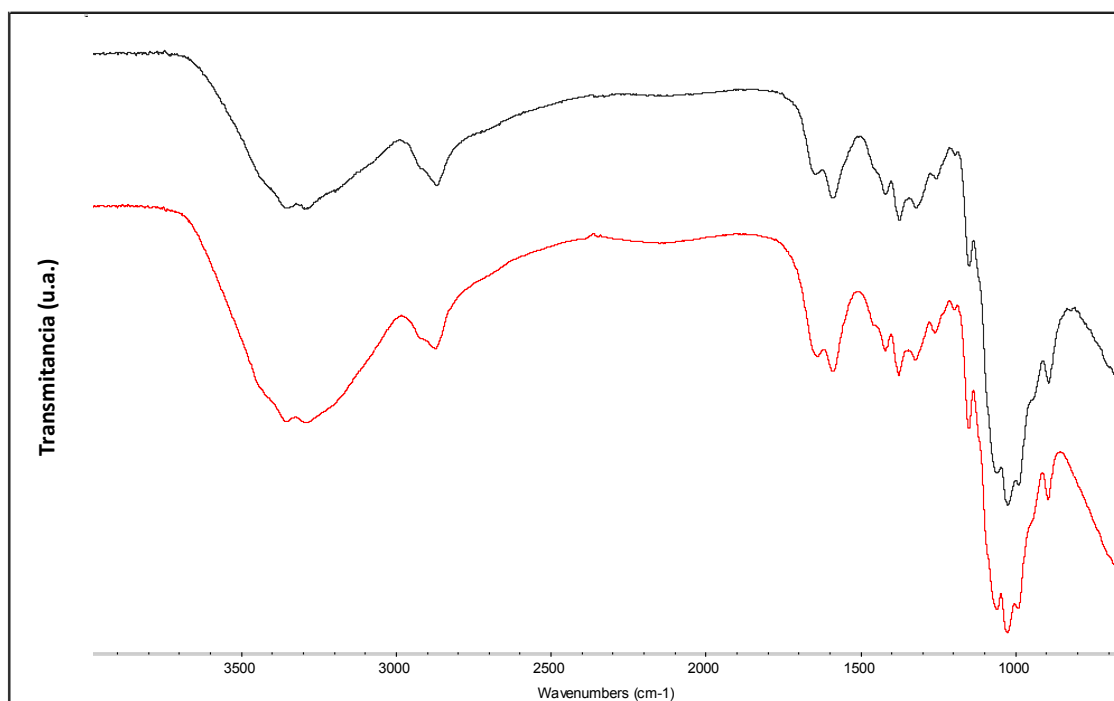
Por lo expuesto, la superficie de vidrio mostró ser la más adecuada para la obtención de las películas investigadas en este trabajo, por lo que fue la seleccionada a fin de realizar la preparación de las mismas junto a la etapa de neutralizado para facilitar su desmolde.



**Figura 4.1-** Espectros FTIR de quitosano en polvo (negro) y de las películas obtenidas sobre superficie de teflon antes y después de la neutralización (azul: sin neutralizar; rojo: neutralizada)



**Figura 4.2-** Espectros FTIR de quitosano en polvo (negro) y de las películas obtenidas sobre superficie de polipropileno antes y después de la neutralización (azul: sin neutralizar; rojo: neutralizada)

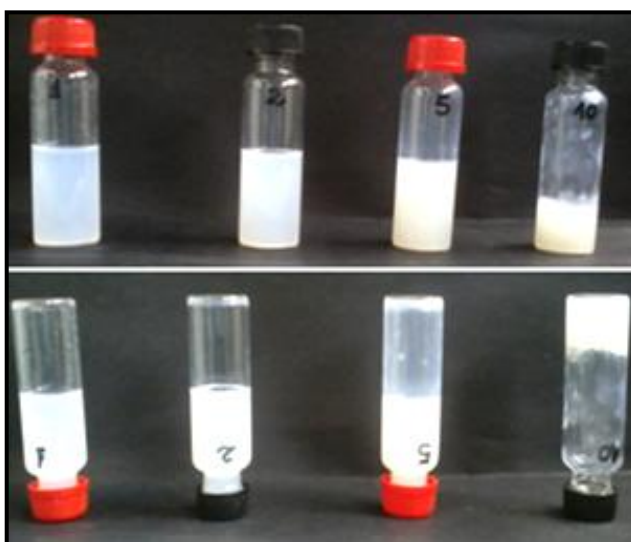


**Figura 4.3-** Espectros FTIR de quitosano en polvo (negro) y de la película obtenida sobre superficie de vidrio (rojo: película neutralizada)

## 4.2- Dispersiones de nanocristales de celulosa

### 4.2.1- Preparación de dispersiones acuosas de CN

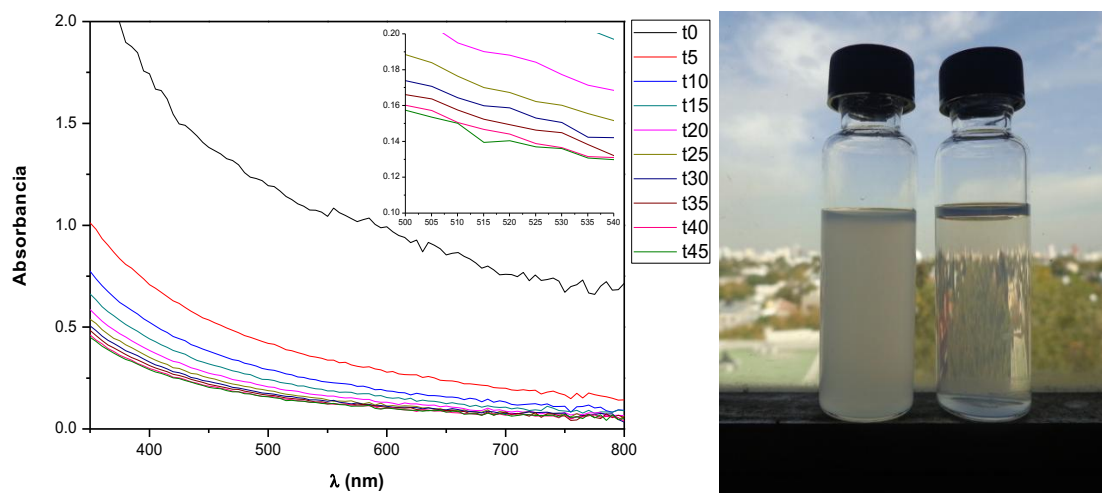
Las dispersiones acuosas preparadas en este trabajo con concentraciones de CN al 1 y 2 %p/v mostraron ser estables en el tiempo y homogéneas, sin la presencia visual de agregados. La dispersión con contenido de CN del 5 % p/v presentó una alta viscosidad, mientras que a un contenido del 10 % p/v se produjo la formación de gel como se muestra en la **Figura 4.4**. Con el objetivo de obtener el mayor grado de dispersión, se seleccionó la preparación de CN al 1% para ser empleada en la preparación de las películas compuestas.



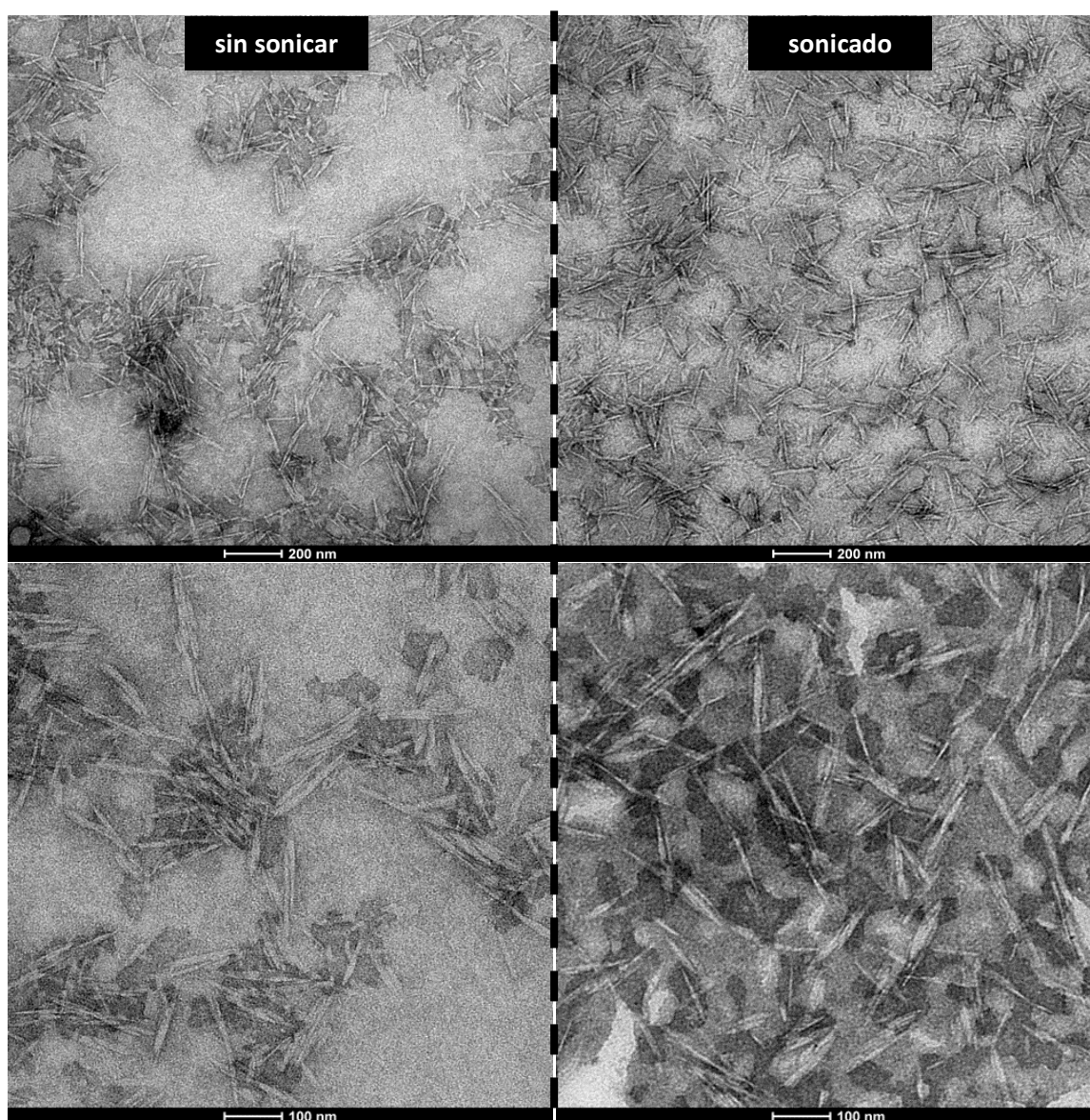
**Figura 4.4-** Dispersiones acuosas de CN al 1, 2, 5 y 10 %p/v

#### **4.2.2- Ensayo de sonicación de una dispersión de CN al 1% p/v en solución acuosa de ácido acético**

Los espectros UV-Vis. obtenidos de la muestra a intervalos de 5 minutos se presentan en la **Figura 4.5**. En la misma se puede observar que a medida que se incrementa el tiempo de sonicado se produce una disminución de la absorbancia, sin registrar cambios importantes luego de los 35 minutos. Esto se interpreta como la obtención de una mejor dispersión del nanorefuerzo en el medio acuoso como consecuencia del proceso de sonicación, favoreciéndose de esta manera la ruptura de agregados con tamaños que provocan dispersión de luz con longitudes de onda en la región del espectro visible. Este efecto también se puede comprobar de manera cualitativa al comparar las dispersiones antes y después de dicho procedimiento, donde se observa un cambio en el aspecto óptico de las mismas como puede apreciarse en las imágenes de la **Figura 4.5**. Con el objeto de comprobar estas interpretaciones, se analizaron imágenes obtenidas por TEM de una dispersión de CN al 1 % p/v en ácido acético antes y después de sonicar durante 40 minutos. En las imágenes correspondientes a la dispersión sin sonicar se observó la presencia de agregados de CN de aproximadamente 200 nm, mientras que en las imágenes obtenidas a partir de la dispersión sonicada se observó una mayor dispersión de los mismos (**Figura 4.6**).



**Figura 4.5-** Espectro UV-Vis a diferentes tiempos de sonicación (izq). Fotografía de dispersión antes y después de la sonicación (der).



**Figura 4.6-** Imágenes TEM obtenidas a partir de dispersiones de CN sin sonicar (izq.) y después de sonicar (der.)



#### **4.3- Caracterización de películas nanocompuestas**

Las propiedades físicas, térmicas y mecánicas de los sistemas poliméricos en general, están dadas por su microestructura. En el caso particular de los materiales nanocompuestos, tienen especial relevancia las características fisicoquímicas del nanorefuerzo empleado así como su incorporación, distribución e interacción con la matriz polimérica, ya que al emplear un refuerzo a escala del nanómetro se presenta una elevada área de interfaz por unidad de volumen, por lo que las distancias entre el polímero y el refuerzo son extremadamente cortas, y se producen cambios en el material que pueden derivar en modificaciones considerables en cuanto a sus propiedades.

Las técnicas de caracterización que aportan información valiosa y permiten estudiar estos sistemas son numerosas; microscopía electrónica de barrido, espectroscopia infrarroja y UV-visible, calorimetría diferencial de barrido, ángulo de contacto, ensayos mecánicos de tracción, son algunas de las más utilizadas y que han sido empleadas en este trabajo.

##### **4.3.1- Obtención de películas Q-CN y Q-CN-G**

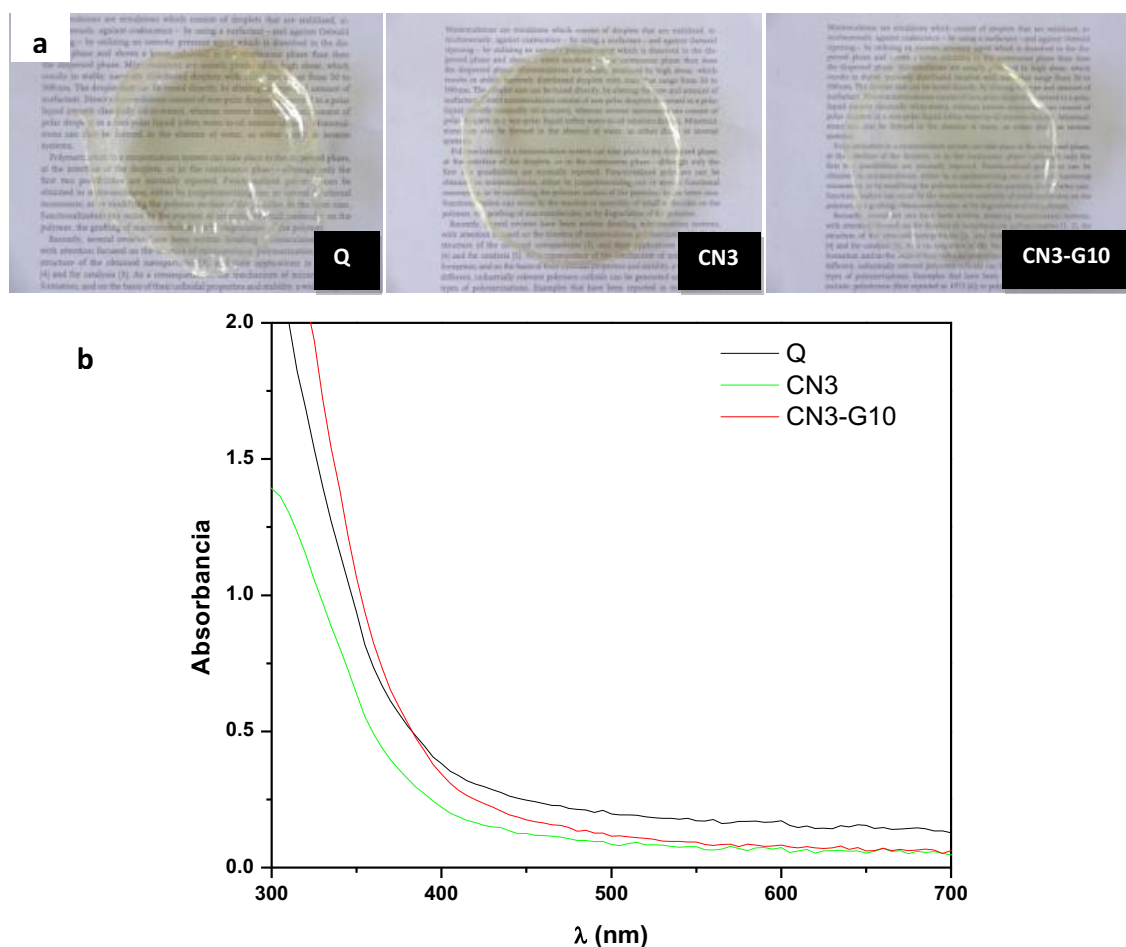
Siguiendo el método propuesto en este trabajo se prepararon las dispersiones de Q-CN y Q-CN-G necesarias empleando sonicador de punta. Éstas formaron películas uniformes por moldeo (*casting*) sobre cajas de petri de vidrio, las cuales fueron desmoldadas sin inconvenientes luego de la neutralización con NaOH. Esta técnica permitió obtener películas con espesores de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ , el cual podía variarse según la cantidad de la dispersión utilizada durante el casting y/o las dimensiones del molde empleado.

Las películas nanocompuestas obtenidas son brillantes y transparentes (a excepción de la película con mayor contenido de CN), con una leve tonalidad que se vuelve amarillenta a medida que aumenta el contenido de quitosano. A simple vista no se detectaron imperfecciones en la superficie, y presentaron una textura lisa. Las películas que fueron plastificadas con glicerol exhibieron mayor flexibilidad.

##### **4.3.2- Espectroscopia UV-Visible**

La transparencia es una propiedad de gran interés en el estudio de materiales destinados a ser utilizados en el envasado de alimentos debido a su gran impacto sobre la apariencia del producto, por lo que influye en la aceptación del mismo por el potencial consumidor.

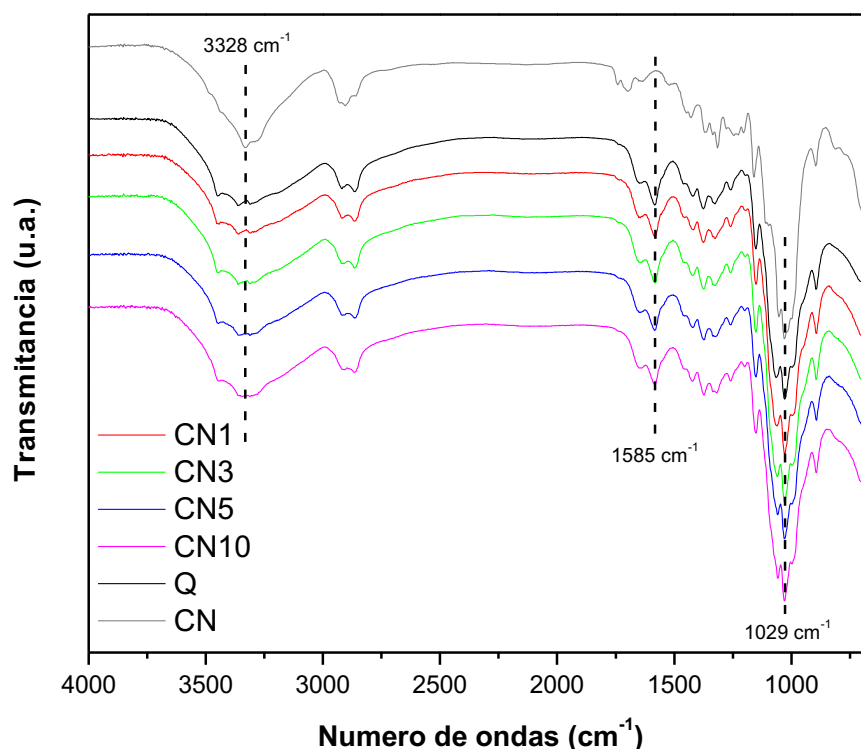
En la **Figura 4.7** se presentan imágenes de algunas películas obtenidas en este trabajo (**Figura 4.7a**), como también los espectros UV-Visible registrados para las mismas (**Figura 4.7b**). Todas ellas presentaron una alta transmitancia en la región visible del espectro ( $\sim 65\%$ ), lo cual caracteriza a estos materiales como sistemas de alta transparencia.



**Figura 4.7-** Fotografía de las películas obtenidas (a) y espectros UV-Visible (b) de las muestras Q, CN3 y CN3-G10.

### 4.3.3- Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica de gran utilidad ya que permite caracterizar materiales y la observación de cambios en los espectros debido a las interacciones que se producen entre los grupos funcionales de la matriz polimérica, o entre éstos y los grupos funcionales de los diferentes aditivos incorporados a ella. En la **Figura 4.8** pueden observarse los espectros FTIR de Q, de CN y de los materiales compuestos Q-CN preparados en este trabajo.



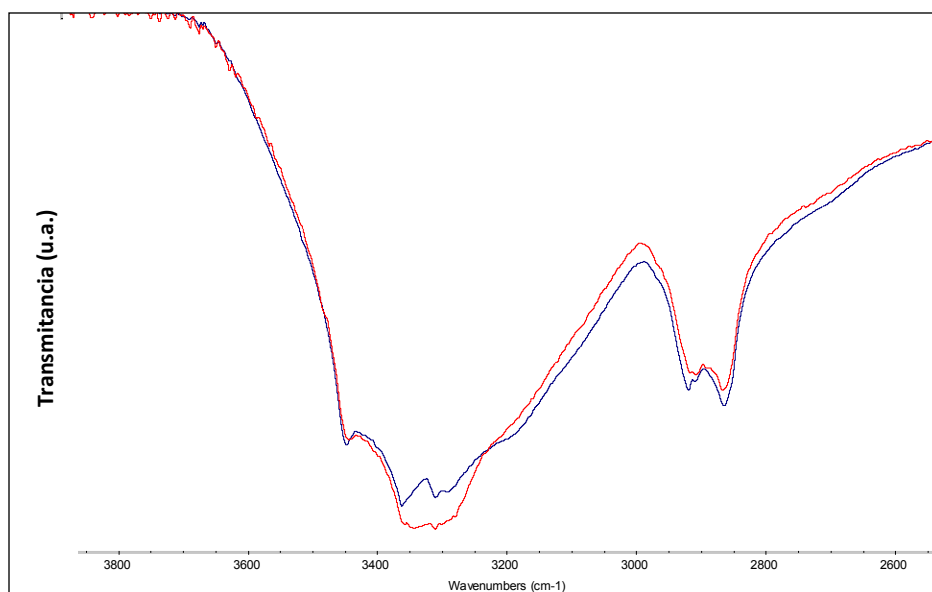
**Figura 4.8-** Espectros FTIR de las muestras de Q, CN y de las películas nanocompuestas preparadas en este trabajo.

Las señales observadas tanto para Q como para CN son similares a las descritas por diferentes autores. Las principales señales que se observan en la película de Q fueron las bandas localizadas a  $1647\text{ cm}^{-1}$ , asignada al estiramiento del grupo C=O ( $\nu\text{C=O}$ ; banda Amida I), a  $1585\text{ cm}^{-1}$ , asignada a la combinación de las vibraciones de flexión del grupo N-H con el estiramiento del grupo C-N ( $\nu\text{C-N}+\delta\text{N-H}$ ; banda Amida II). La absorción observada a  $1029\text{ cm}^{-1}$  se asigna al estiramiento C-O y la banda ancha ubicada por encima de los  $3000\text{ cm}^{-1}$  se debe principalmente a la superposición de las vibraciones de estiramiento de los grupos O-H y N-H ( $3500\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$  y  $3400\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente) [Lagaron y col., 2007; Berghoff, 2011]. En el espectro de CN se identifican las bandas  $1636\text{ cm}^{-1}$  (flexión del grupo O-H de agua absorbida),  $1430\text{ cm}^{-1}$  (*scissoring* del grupo  $\text{CH}_2$  en la celulosa),  $1375\text{ cm}^{-1}$  (*bending* del grupo C-H),  $1317\text{ cm}^{-1}$  (*wagging* del grupo  $\text{CH}_2$ ),  $1155\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-C en el anillo),  $1105\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C glicosídico),  $1054\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-O-C del anillo piranosa),  $1029\text{ cm}^{-1}$  (estiramiento C-C del anillo piranosa) y a  $902\text{ cm}^{-1}$  asociado con los enlaces  $\beta$ -glicosídicos en la celulosa [Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011; Kumar y col., 2014].

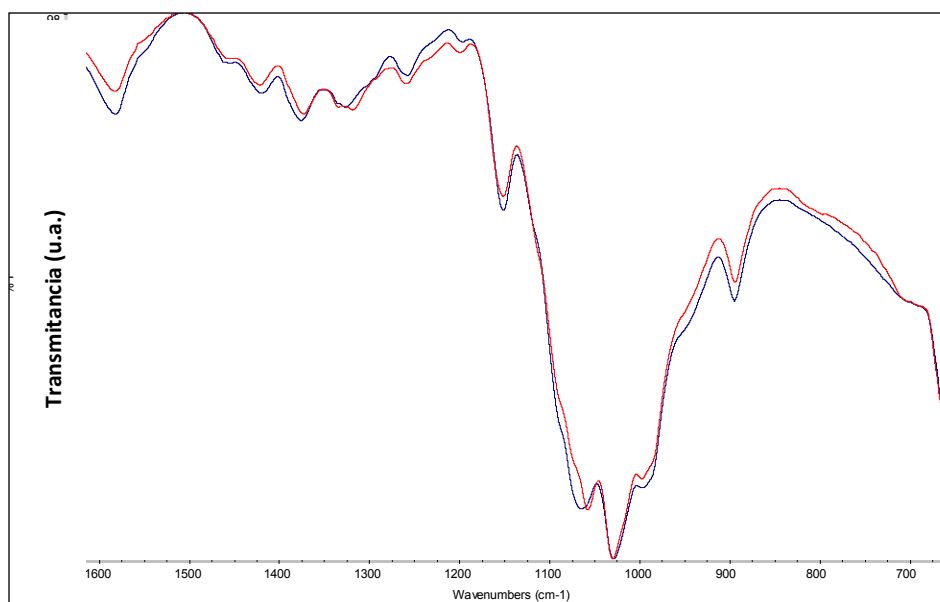
Debido a la naturaleza similar de los componentes que conforman a los sistemas preparados, se identificó una leve contribución de los CN en los espectros FTIR de las películas compuestas a través del incremento de la intensidad de la banda perteneciente al estiramiento O-H, lo cual se presenta en detalle en la **Figura 4.9** para la muestra CN10 en comparación con la



película de Q. En adición, se observó un pequeño corrimiento de la banda localizada a  $1066\text{ cm}^{-1}$ , relacionada al estiramiento C-O en Q, hacia un menor número de ondas (**Figura 4.10**), sugiriendo una leve interacción entre ambos materiales.

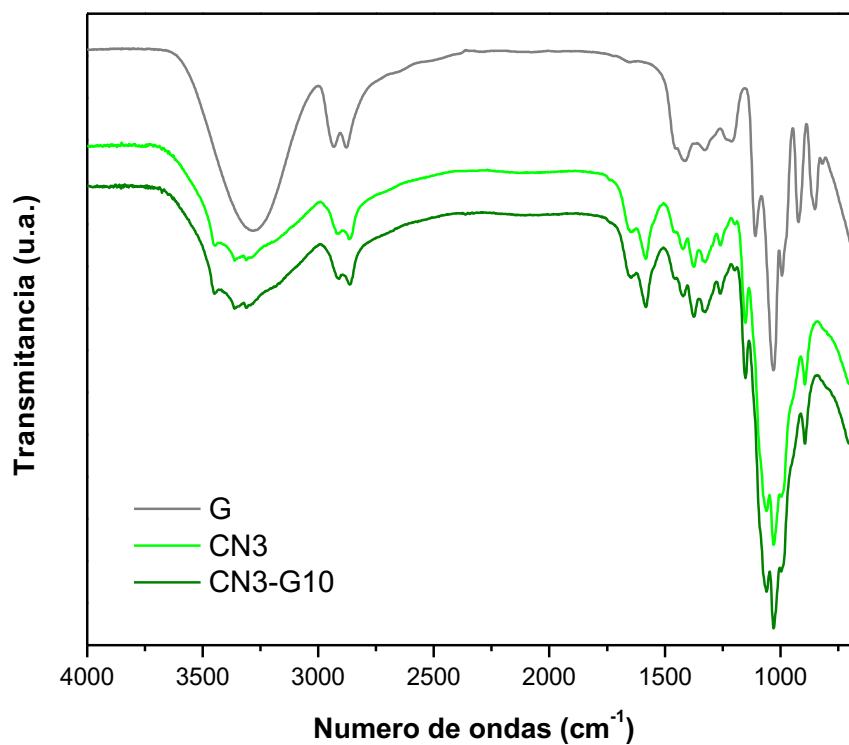


**Figura 4.9-** Espectros FTIR de las muestras Q (azul) y CN10 (rojo) en la región  $3800\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 4.10-** Espectros FTIR de las muestras Q (azul) y CN10 (rojo) en la región  $1600\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ .

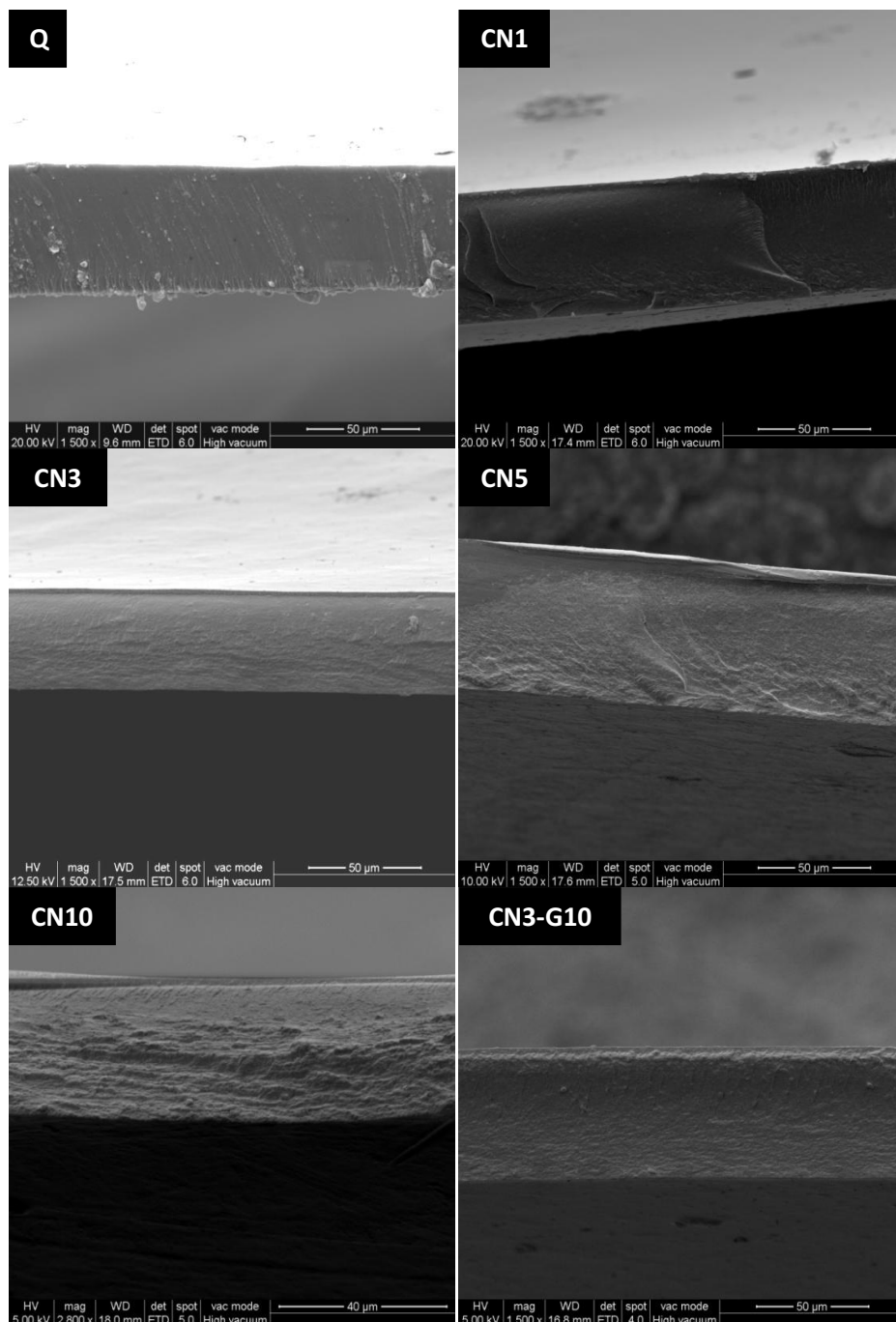
Por otra parte, no se observaron cambios significativos con la incorporación de G en las muestras, como surge de los espectros que se presentan en la **Figura 4.11**, en los cuales se observó un leve incremento de la intensidad en las regiones correspondientes al estiramiento O-H y C-O-C.



**Figura 4.11.** Espectros FTIR de glicerol y de la muestra Q-CN3 con y sin glicerol.

#### **4.3.4- Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido se utilizó para la observación de la morfología de las películas de Q y de los materiales compuestos preparados en este trabajo. Las imágenes obtenidas para la superficie de fractura y las superficies algunas muestras seleccionadas se presentan las **Figuras 4.12 y 4.13**, respectivamente.

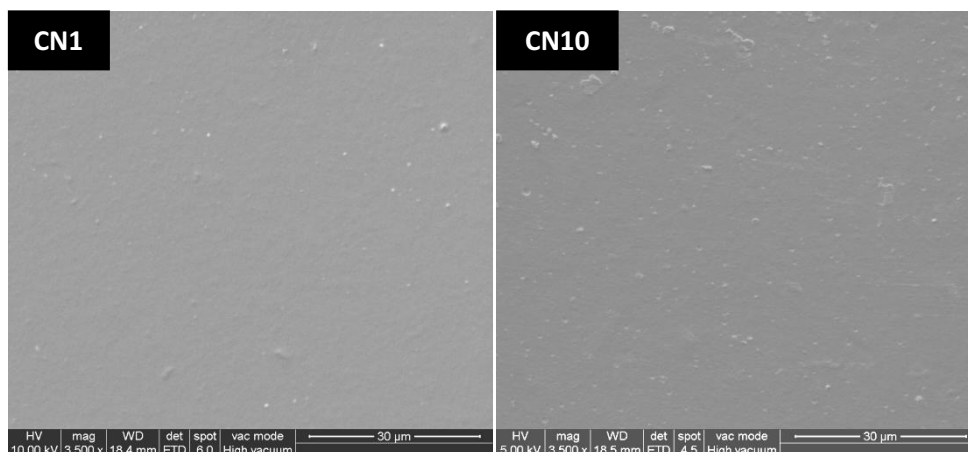


**Figura 4.12-** Imágenes SEM de la superficie de fractura de algunas muestras preparadas en este trabajo.

Al observar las superficies de fractura, se puede apreciar que las películas conteniendo 1 %p/p de CN presentó un corte similar al observado para el Q puro. Sin embargo, al incorporar una cantidad adicional de este nanorefuerzo se observó la generación de una superficie de fractura levemente más rugosa, característica que se incrementa a medida que aumenta el contenido de nanorefuerzo, como puede apreciarse en las imágenes obtenidas para las demás muestras (CN3, CN5 y CN10). Esto sugiere una distribución más homogénea del material dentro de la película cuando el nanorefuerzo incluido se encuentra a bajas concentraciones. Por otro lado, la

incorporación de glicerol a las películas produce un efecto plastificante conduciendo a una homogeneización del material cuando se comparan las imágenes obtenidas para la muestra CN3-G10 con la muestra correspondiente sin glicerol.

Si bien la superficie del Q presentó una rugosidad intrínseca, con la incorporación de CN se observa la aparición en la superficie de agregados, lo cual estaría indicando que la incorporación del material no es completamente homogénea (**Figura 4.13**).



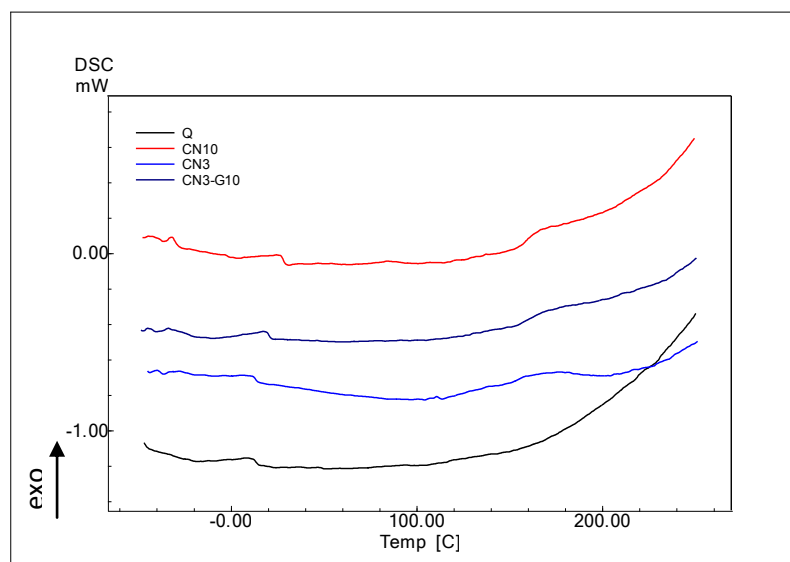
**Figura 4.13-** Imágenes SEM de la superficie de CN1 y CN10.

#### 4.3.5- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las muestras seleccionadas para caracterizarse mediante DSC fueron Q, Q-CN3, Q-CN3-G y Q-CN10 y sus termogramas (segundo barrido) se presentan en la **Figura 4.14**.

A menudo es difícil determinar la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de quitosano a partir de sus curvas de DSC. En general, se obtiene un pico endotérmico debido a la evaporación del agua durante el análisis, que se superpone a otros eventos térmicos (por ejemplo la  $T_g$ ), como se observó en el primer barrido para las muestras ensayadas en este trabajo (resultados no presentados). La presencia de agua en Q actúa como plastificante y reduce valores de  $T_g$  [Dhawade y Jagtap, 2012]. En nuestro caso, para el segundo barrido (**Figura 4.14**), en la muestra de Q se observó una temperatura de transición a 12,9 °C, que no se corresponde con lo reportado en la bibliografía para la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de este polímero. En aquellos casos en los que ha sido posible observarla, se reportaron valores de  $T_g$  a temperaturas cercanas a la de su descomposición térmica [Dong y col., 2004].

En el caso de CN (resultados no presentados) se observó un pico endotérmico alrededor de 110 °C durante el primer barrido, que se atribuye a la evaporación del agua contenida en la muestra, sin observar ninguna transición en el segundo barrido realizado hasta los 150 °C. [A. J. de Menezes y col., 2009].



**Figura 4.14-** Curvas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de algunas muestras seleccionadas de este trabajo.

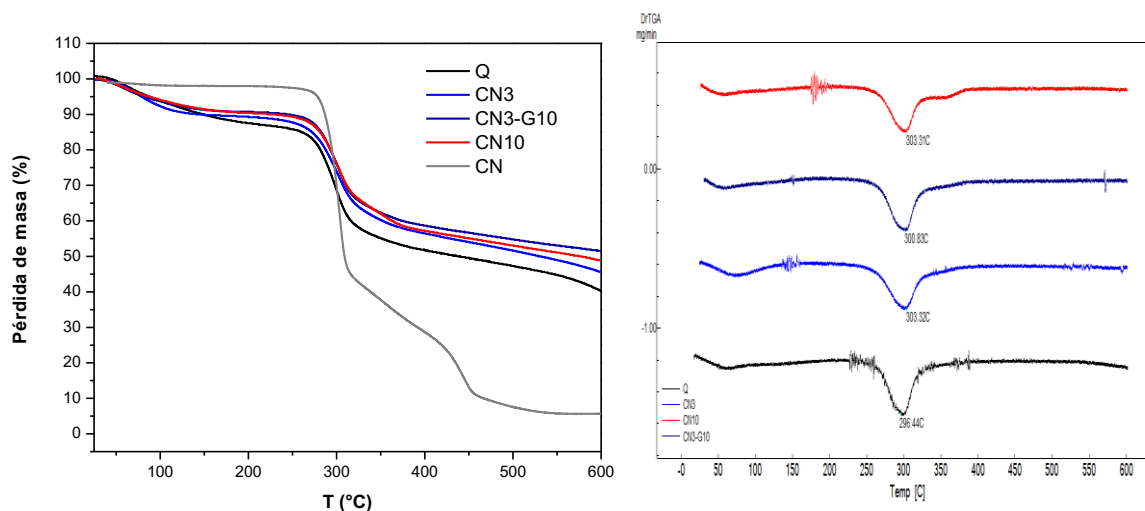
Cuando se comparó el valor de la transición observada en la muestra de Q con los obtenidos para las muestras CN3 y CN10 (12,9 °C y 20,31 °C, respectivamente), se vio un aumento de la Tg en la muestra con mayor contenido de nanorefuerzo. En la muestra conteniendo G (CN3-G10) dicha transición se observó a 20,3 °C, contrario a la disminución de Tg que se espera al incorporar un plastificante que por lo general incrementa la movilidad de las cadenas poliméricas.

El aumento observado en esta transición podría relacionarse a la interacción entre los nanocristales de celulosa y el quitosano en acuerdo con lo observado por FTIR. [Celebi y Kurt, 2015; Azeredo y col., 2010]. Sin embargo, al no poder asignar correctamente esta transición, no es posible obtener mayor información a partir de esta técnica.

En adición, se observaron otras transiciones en las muestras conteniendo CN y que no fueron encontradas en Q: una transición exotérmica a alrededor de 160 °C y una señal adicional a aproximadamente -30 °C. Ambas señales no pudieron ser asignadas en base a la información bibliográfica disponible.

#### 4.3.6- Análisis termogravimétrico (TGA)

Las curvas de TGA de algunas muestras seleccionadas se presentan en la **Figura 7**.



**Figura 4.15-** Curvas de degradación térmica (TGA) y sus derivadas (dTGA) de algunas muestras seleccionadas de este trabajo.

El comportamiento de degradación térmica de los CN mostró una pérdida de 2,4 % de su masa inicial por su calentamiento desde temperatura ambiente hasta 130 °C, la cual se atribuye a la evaporación de agua presente en la muestra. A temperaturas mayores a 150 °C, la degradación ocurre dentro de un rango de temperatura más amplio y muestra dos procesos de pirólisis bien separados. Un proceso se produce entre 150 y 350 °C (aproximadamente 60% de pérdida de masa) y el otro entre 350 y 500 °C (un 30% de pérdida de masa adicional), en acuerdo con lo reportado en la bibliografía para una muestra de CN con grupos sulfatos neutralizados [Lu y Hsieh, 2010; Wang y col., 2007; de Menezes y col., 2009; Lin y Dufresne, 2014]. En el primer proceso la pérdida de masa se debe a la despolimerización, deshidratación y descomposición de unidades de glicosilo, que resulta en la formación de compuestos volátiles seguido por una carbonización [Cao y col., 2009]. El segundo proceso, el cual sucede con una tasa de pérdida de masa menor, se atribuye a la oxidación y descomposición del residuo carbonoso a productos gaseosos de bajo peso molecular [Celebi y Kurt, 2015].

En la película de Q, a temperaturas menores a 150 °C la curva de TGA mostró una pérdida de masa que se atribuyó a la evaporación de agua contenida en la muestra (aproximadamente 13%). Posteriormente, el termograma presentó un solo paso de pérdida de masa seguido de una disminución gradual de la velocidad de descomposición hasta alcanzar un valor de residuo de aproximadamente 45%, indicando que la degradación térmica del quitosano en atmósfera de nitrógeno es una reacción de una etapa [Hong y col., 2007; Youssef y col., 2015]. Para esta muestra, la mayor pérdida de masa se identificó a 296,4 °C en la curva de dTGA (**Figura 4.15**,

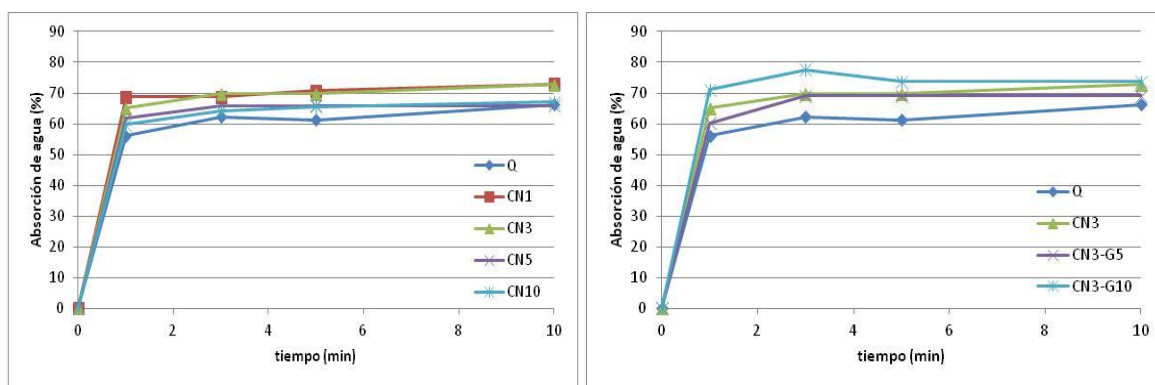
derecha) que corresponde a la degradación de las cadenas de quitosano a través de la desacetilación y la escisión de enlaces glicosídicos vía deshidratación y desaminación [Celebi y Kurt, 2015].

Todas las muestras que contienen CN mostraron un comportamiento térmico similar a la muestra de Q. Se encontró que el efecto de la incorporación de CN a la matriz polimérica produjo un incremento de la temperatura de descomposición máxima de aproximadamente 7 °C en base a los picos observados en las curvas de dTGA de CN3 y CN10 (303,3 °C), indicando un pequeño aumento de la estabilidad térmica en estas muestras respecto a Q, independientemente del contenido de CN. En adición, fue posible observar en las curvas de CN10 una clara contribución del nanorefuerzo al perfil de degradación térmica de la muestra por la aparición de un pequeño paso de degradación térmica a aproximadamente 350 °C, asociado al segundo paso de descomposición de los CN, el cual puede corroborarse por la aparición de un pequeño pico en la curva dTGA de CN10. La incorporación de G al material produjo una disminución de la temperatura a la cual se observó la máxima descomposición (muestra CN3-G10;  $T_{d_{max}}=300,8$  °C) en comparación con la muestra sin glicerol (CN3).

#### **4.3.7- Absorción de agua**

La absorción de agua es una propiedad de gran importancia ya que ayudará a la elección de un material para su uso como envase de determinado tipo de alimento, debido a la compatibilidad/resistencia que tenga el envase al alimento. Por ejemplo, para un alimento de elevada actividad acuosa o que tenga tendencia a exudar agua durante su almacenamiento, es deseable un envase que tenga alta resistencia a la absorción de agua para lograr mayor efectividad en la conservación.

Las curvas de absorción de agua en función del tiempo para el Q y las películas compuestas se muestran en la **Figura 4.16**. Todas las muestras presentaron curvas con un comportamiento similar, comenzando con una rápida absorción de agua en los minutos iniciales seguida de una suave nivelación de la curva a su nivel de saturación a mayores tiempos de inmersión.



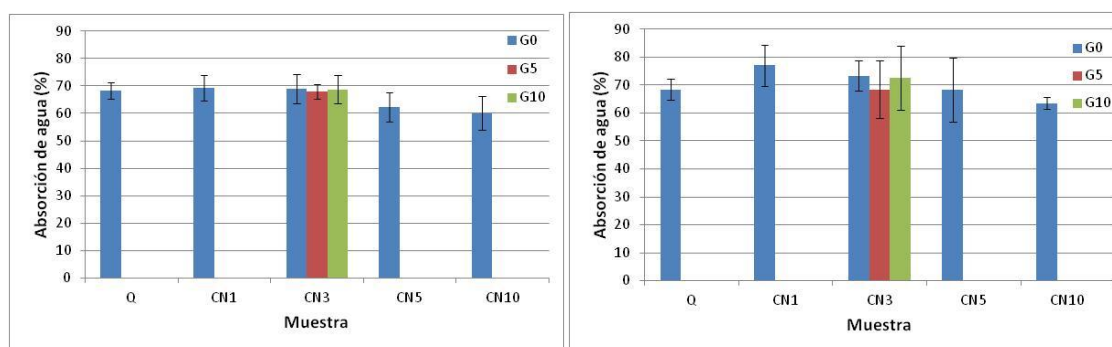
**Figura 4.16-** Curvas representativas del ensayo de absorción de agua de las muestras preparadas en este trabajo: Efecto del contenido de CN (izq). Efecto del contenido de G (der).

Los niveles de absorción de agua a los 10 min y 24 hs se presentan en la **Figura 4.17**. A partir de estos valores se pudo observar que el contenido de CN tiene un efecto sobre el comportamiento de absorción de agua de las películas. Para tiempos cortos (10 minutos; Figura 4.17, derecha) se observó que las muestras con contenidos mayores a 5 % p/p de CN mostraron una tendencia a absorber una menor cantidad de agua en comparación con la matriz polimérica. Sin embargo, al analizar los valores obtenidos a las 24 hs, se encontró un ligero aumento de la captación de agua para las muestras con menor contenido de nanorefuerzo (CN1 y CN3), disminuyendo este parámetro con cantidades adicionales de CN. Una posible explicación para este comportamiento puede ser propuesta en base a la mayor hidrofiliicidad del nanorefuerzo en comparación con la matriz polimérica, que a bajos contenidos de carga favorece el ingreso de agua. Por otro lado, la disminución en la absorción de agua para contenidos altos de CN puede estar relacionada a un efecto de barrera asociado con estas nanopartículas que, aún siendo de naturaleza hidrofílica, debido a su gran relación de aspecto bloquean físicamente la penetración de moléculas de agua. Las muestras conteniendo glicerol (CN3-G5 y CN3-G10) no presentaron cambios significativos en los valores de absorción de agua a 10 min y 24 hs en comparación con su referencia CN3, indicando que el agregado del plastificante no influye sobre esta propiedad al menos para estas composiciones.

Sin embargo, al observar las cinéticas de absorción de agua, se encontró una tendencia en CN3-G10 hacia un rápido aumento inicial de la masa de agua absorbida hasta alcanzar un máximo a aproximadamente 3 min, seguido por una suave disminución del porcentaje de agua absorbido hacia un nivel de saturación (**Figura 4.16**, derecha). Este comportamiento inicial podría estar relacionado a la naturaleza hidrofílica del glicerol, el cual provoca una mayor afinidad del material con el agua. No obstante, la posterior disminución observada en los niveles de absorción de agua podría vincularse a la liberación de este componente al medio acuoso, asemejando finalmente su



comportamiento al de la muestra de referencia sin glicerol. Esto deberá corroborarse con ensayos adicionales que permitan estudiar este fenómeno a menores tiempos de absorción.

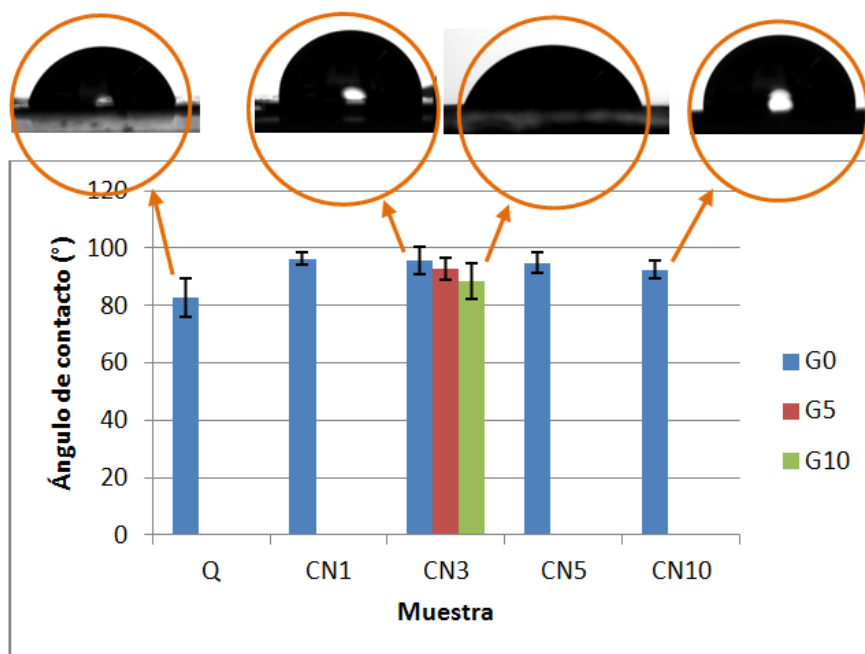


**Figura 4.17-** Valores de absorción de agua a 10 min (izq) y 24h (der) de los materiales compuestos preparados en este trabajo.

#### 4.3.8- Ángulo de contacto

Una superficie de elevada higroscopicidad en películas diseñadas para estar en contacto con alimentos provocará una disminución en la eficacia del envasado como método de conservación. Los valores de ángulo de contacto al agua para las películas preparadas en este trabajo se presentan en la **Figura 4.18**. En general, se observó un incremento del ángulo de contacto con la incorporación de CN independientemente del contenido de este nanorefuerto en comparación con la muestra de Q puro, dando cuenta de la generación de una superficie más hidrofóbica. Esto puede deberse al aumento de la rugosidad superficial en estos sistemas, tal como pudo observarse por SEM [Celebi y Kurt, 2015].

En el caso de las películas conteniendo G se observó una leve disminución del ángulo de contacto en comparación con la muestra Q-CN3, en acuerdo con la incorporación de un componente hidrofílico, aunque dicho cambio se encuentra dentro del error experimental.

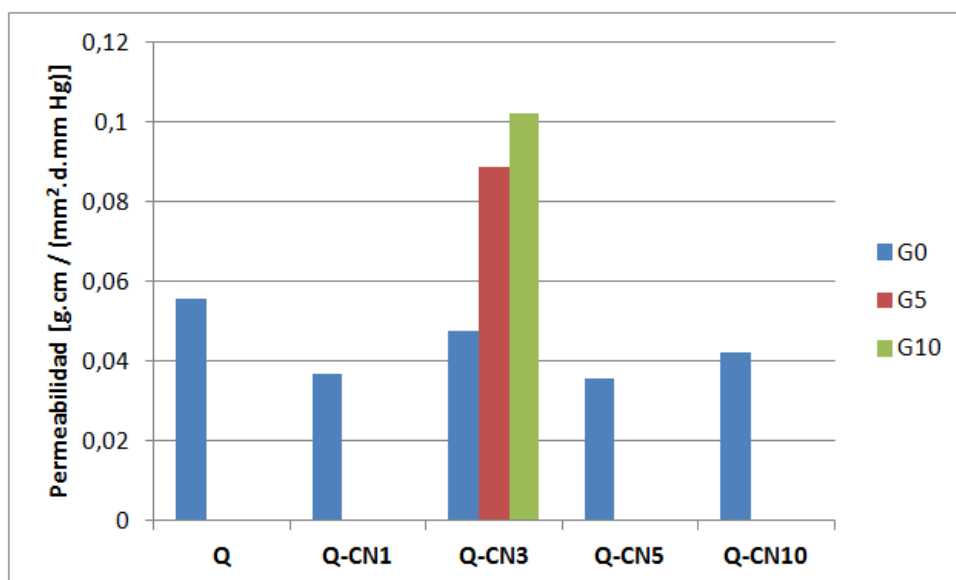


**Figura 4.18-** Ángulo de contacto al agua de las películas preparadas en este trabajo.

#### 4.3.9- Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

En las películas destinadas al envasado de alimentos, es de interés que la transferencia de humedad entre el producto y la atmósfera circundante sea lo más baja posible, ya que dicha transferencia podría reducir el tiempo de conservación. El efecto de la concentración de CN en la WVP de las películas de Q se muestra en la **Figura 4.19**. Los valores de WVP disminuyeron levemente con la incorporación de CN. Se cree que la presencia de CN aumenta la tortuosidad en las películas de Q, lo que conduce a procesos de difusión de las moléculas de agua más lentos y, por tanto, a una menor permeabilidad. Por otro lado, el agregado de glicerol afectó notablemente al comportamiento de esta propiedad, en acuerdo con la incorporación de un material de naturaleza higroscópica y que aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas, condujo a un notable incremento de los coeficientes de difusión para el vapor de agua.

Es importante destacar que debido al área de la película necesaria para la realización de este ensayo, además de la calidad de la película requerida por éste (ausencia de fallas, poros, burbujas), el mismo fue realizado sólo una vez para cada muestra, por lo que los resultados aquí presentados deben ser considerados como indicadores de tendencias. No obstante, los mismos están de acuerdo con los resultados reportados en la bibliografía [Azeredo y col., 2010].

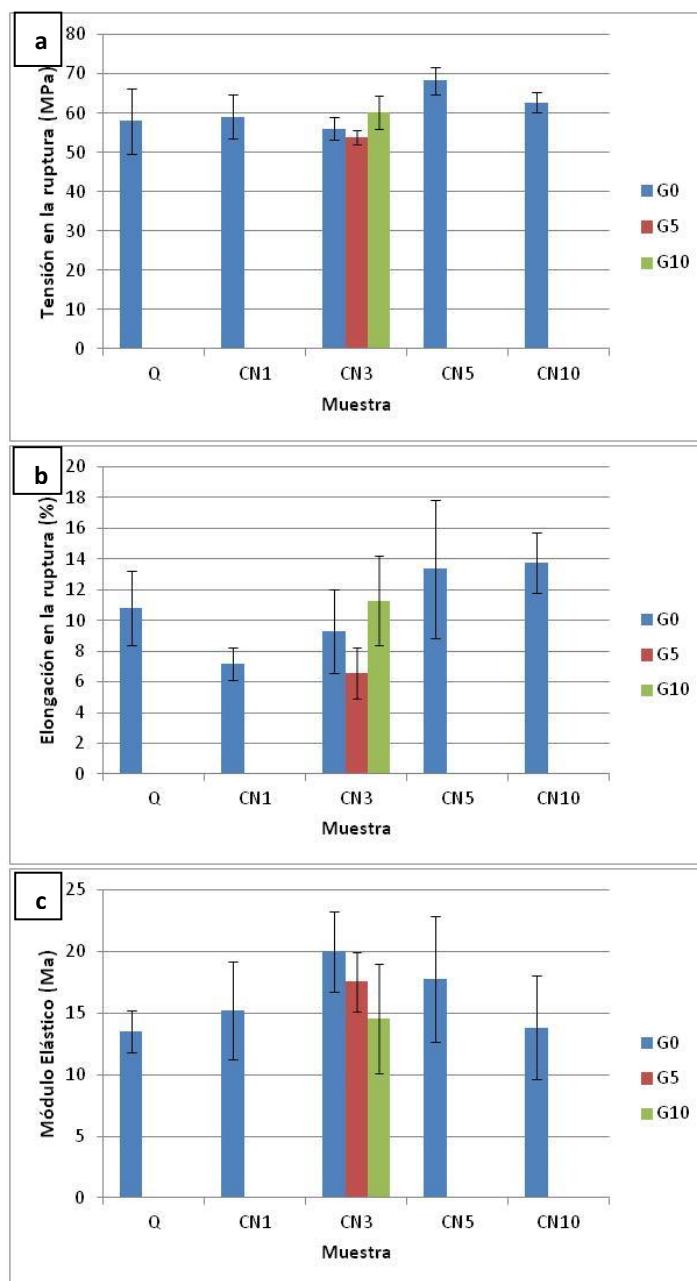


**Figura 4.19-** Permeabilidad al vapor de agua de las películas preparadas en este trabajo.

#### 4.3.10- Propiedades mecánicas

El envasado, entre otras funciones, protege al producto de posibles daños físicos y facilita el manipuleo durante toda la cadena de distribución. Dependiendo la jerarquía (envase primario, secundario o terciario) y utilización que le queramos otorgar al envasado, será importante considerar las propiedades mecánicas que presenta el material para evaluar su adecuación. En general, un envase para alimentos debe ser un material que no se deforme en exceso, para proveer integridad estructural o reforzar la estructura del producto (por ejemplo: bandejas, recipientes) o, por el contrario, una película altamente deformable para aplicaciones tales como envoltura de alimentos.

En esta sección se presenta y compara la resistencia a la tracción de Q y las películas nanocompuestas preparadas en este trabajo. La **Figura 4.20** muestra los valores del módulo de elasticidad o módulo de Young (E), y la elongación y tensión en el punto de ruptura ( $\epsilon_R\%$  y  $\sigma_R$ , respectivamente) obtenidas a partir de las curvas de tensión vs deformación. El valor E indica la mayor o menor capacidad de un material de deformarse bajo tensiones y puede ser interpretado como la rigidez del mismo, es decir, su resistencia a la deformación elástica, de tal modo que cuanto mayor es el módulo de Young más rígido es el material. La fragilidad del material la indicará el valor  $\epsilon_R\%$ , ya que un material frágil no sufre deformaciones plásticas significativas, presentará bajo porcentaje de elongación y la probeta se romperá de forma brusca, momento en el cual se determina  $\sigma_R$ , que dará una idea la carga máxima que el material puede resistir antes de romperse.



**Figura 4.20-** Parámetros obtenidos a partir de las curvas de tensión vs deformación de las películas preparadas en este trabajo. a) Tensión en el punto de ruptura,  $\sigma_R$ ; b) Elongación porcentual en el punto de ruptura, ( $\epsilon_R$  %); c) Modulo elástico, (E).

Al analizar los valores obtenidos de  $\sigma_R$ , no se observaron cambios significativos en este parámetro con la incorporación de CN y/o G. No obstante, al evaluar los resultados obtenidos para  $\epsilon_R$  % y E, se pudieron observar efectos relacionados con el contenido de CN. En el caso de  $\epsilon_R$  %, se observó una disminución de este parámetro con la incorporación de un 1 %p/p de CN en comparación con la muestra de Q, con un posterior aumento hasta alcanzar un valor estable para contenidos mayores a 5 %p/p. Por otra parte, para el E se observó un aumento de este parámetro a medida que aumenta el contenido de CN hasta incorporar un 3 % p/p de

nanorefuerzo, seguido de una tendencia hacia la disminución del mismo aunque con una gran dispersión en los valores obtenidos.

Tanto la disminución de  $\varepsilon_R\%$  y el aumento de E de las películas compuestas con bajos contenidos de nanorefuerzo se puede atribuir a dos factores: (1) las interacciones nanocristal-polímero y (2) transferencia de tensión efectiva en la interfaz nanocristal-polímero. A bajas concentraciones de CN los nanocristales se dispersan homogéneamente en la matriz polimérica sin existir interacciones entre ellos [Favier y col., 1995], por lo que el incremento de la resistencia mecánica de las películas de nanocompuestos puede deberse a la transferencia de carga eficiente de la red de nanocristales. Más allá de un 3 %p/p de CN, los valores de los parámetros obtenidos sugieren que la adición de CN por encima de este umbral de concentración no ayuda a mejorar las propiedades mecánicas, lo cual puede atribuirse a la agregación de partículas de CN después de alcanzar una cierta concentración [Khan y col., 2012].

No se observaron cambios significativos al evaluar el comportamiento mecánico de las películas conteniendo glicerol, aunque los valores para un contenido de G de 10 %p/p sugieren que este componente conduce a una modificación de las propiedades mecánicas al permitir una mayor movilidad de las cadenas poliméricas, aumentando la flexibilidad del material (menor E) y aumentando la resistencia mecánica (mayor  $\varepsilon_R\%$ ), comparado con la referencia sin glicerol (CN3).

#### **4.3.11- Migración global**

Los materiales que estén destinados a estar en contacto con alimentos, deben cumplir requisitos sanitarios que determinan que en condiciones normales de empleo no produzcan migración hacia los alimentos de componentes indeseables, tóxicos o contaminantes que, en cantidades tales que superen los límites máximos establecidos de migración global o específica (para ciertos componentes o grupo de componentes), represente un riesgo de salud pública o altere las características organolépticas del alimento.

La cantidad máxima admisible de componentes del material en contacto con los alimentos transferida a los simulantes bajo condiciones de ensayo se denomina Límite de Migración Global (LMG) [CAA - cap. IV, 2015]. La migración se puede reportar de dos formas distintas: en términos de masa (en miligramos) de las sustancias que pasan al alimento por unidad superficial del empaque, o en términos de masa (en miligramos) de las sustancias que migran desde el empaque por kilogramo de alimento (partes por millón, o ppm).

En la **Tabla 4.1** se muestran los valores obtenidos del ensayo de migración global a un medio simulante graso en mg de sustancia por unidad superficial ( $\text{mg}/\text{dm}^2$ ). Como en el caso del ensayo de permeabilidad al vapor de agua, se realizó una sola determinación por muestra debido a la gran cantidad de material necesario para llevarlo a cabo ( $1 \text{ dm}^2$ ). Se puede observar que los

valores obtenidos no indican una tendencia clara en el comportamiento de los materiales preparados en relación al contenido de nanorefuerzo, encontrándose casos en los cuales no se detectó residuo luego del contacto entre el material y el medio simulante (muestras CN3 y CN10) a otros donde se encontraron niveles variables de migración entre 6,9 g/dm<sup>2</sup> para Q, hasta 45,5 g/dm<sup>2</sup> para CN3-G10. Los resultados sugieren que el aumento del contenido de glicerol produce un aumento de los valores de MG.

En el CAA, para el caso de material plástico genérico o envases y equipamientos con capacidad menor de 250 ml, el LMG establecido es de 8 mg/dm<sup>2</sup> de área de superficie del envase en contacto con el simulante [Resolución GMC 56/92, CAA]. En base a este límite, es posible observar que la mayoría de los materiales preparados en este trabajo no cumplen con la legislación vigente.

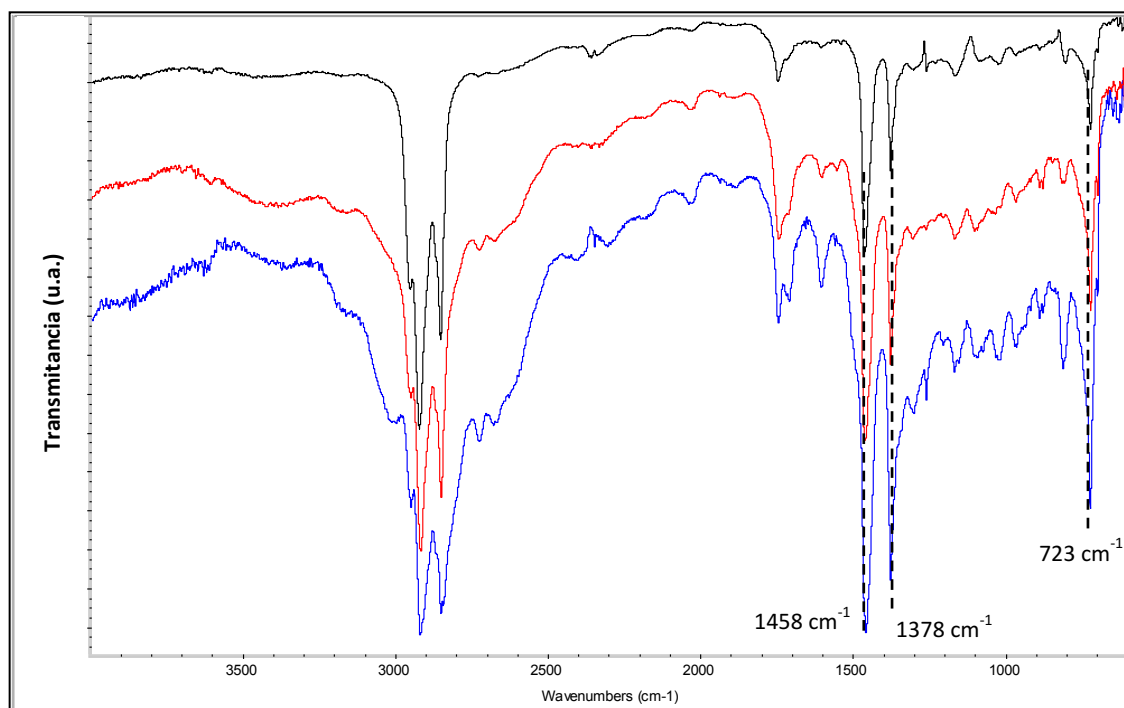
**Tabla 4.1-** Valores obtenidos para la migración global de las películas nanocompuestas preparadas en este trabajo a un medio simulante graso (isooctano)

Muestra	GM		
	mg/dm <sup>2</sup>	FR=3 <sup>1</sup>	FR=5 <sup>1</sup>
Q	6,9	2,3	1.4
CN1	21,8	7,3	4.4
CN3	<LC <sup>2</sup>		
CN5	34,2	11,4	6.8
CN10	<LC <sup>2</sup>		
CN3-G5	16,3	5.4	3.3
CN3-G10	45,5	15,2	9.1
<sup>1</sup> FR= Factor de reducción			
<sup>2</sup> LC: Límite de cuantificación (0.1 mg)			

Sin embargo, según el tipo de alimento a envasar, se establecen para los simulantes alternativos los llamados “factores de reducción”. Este valor hace referencia a que el poder extractivo del solvente sobre el envase es varias veces mayor que el del propio alimento envasado y que, por otro lado, el alimento contiene (en la mayoría de los casos) sólo un porcentaje de material lipídico. Así, el CAA y las normativas extranjeras establecen Factores de Reducción para diferentes alimentos. De esta manera, al utilizar los factores de reducción 3 y 5, empleados en la mayoría de los alimentos, los valores de MG disminuyen y se encuentran en muchos de los casos por debajo de los 8 mg/dm<sup>2</sup> permitidos por la legislación. No obstante, en base a los resultados obtenidos, se considera de importancia estudiar en detalle este parámetro con el objeto de

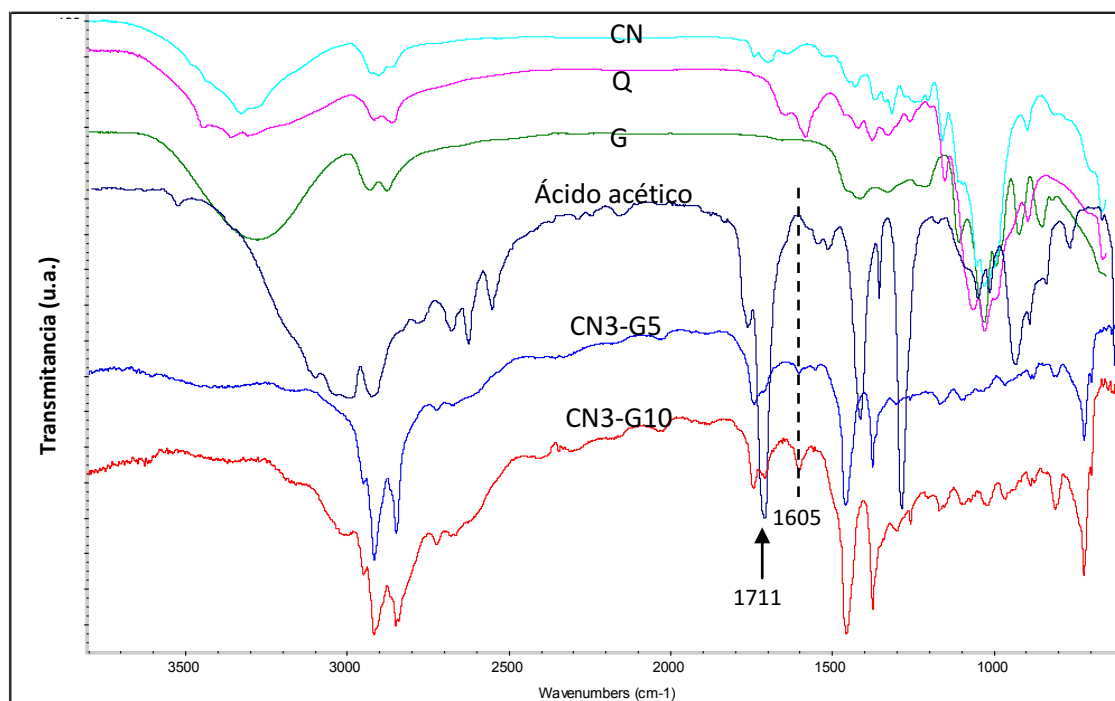
evaluar la aplicación real de estos sistemas como materiales sustentables para el envasado de alimentos.

Luego del ensayo, en los casos que fue posible, los residuos fueron analizados mediante espectroscopia infrarroja a fin de estudiar la composición de los mismos. Los espectros obtenidos se presentan en la **Figura 4.21**.



**Figura 4.21-** Espectros ATR-FTIR de los residuos obtenidos en los ensayos de migración global de las muestras CN5 (negro), CN3-G5 (rojo) y CN3-G10 (azul).

Los espectros de los residuos presentaron bandas de absorción atribuidas a estructuras hidrocarbonadas de cadena larga: bandas localizadas en la región comprendida entre 3000 y 2800  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento C-H de los grupos metilos y metilenos), 1458  $\text{cm}^{-1}$  y 1378  $\text{cm}^{-1}$  (flexión grupos  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ ) y 723  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$   $\tau$ ) similares a las que pueden encontrarse en los *n*-alcanos y asignadas en una sección anterior. También se observó una señal localizada a 1747  $\text{cm}^{-1}$  probablemente relacionada con la presencia de grupos carbonilos. En adición, para los residuos provenientes de las muestras conteniendo glicerol se observa una banda ancha y de baja intensidad a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual revelaría el aporte de grupos O-H por parte de alguna sustancia extraída por el medio simulante, lo que podría vincularse a la remoción de glicerol de las películas. En estas muestras también es posible observar la contribución de una señal localizada a 1711  $\text{cm}^{-1}$  presente con mayor intensidad para la muestra con mayor contenido de glicerol.



**Figura 4.22-** Espectros ATR-FTIR de los residuos de CN3-G5 y CN3-G10 y de los materiales empleados en la preparación de las películas (Q, CN, G y Ácido Acético).

Con el objeto de identificar la composición de los residuos, se realizó la comparación de sus espectros FTIR con los correspondientes a los componentes utilizados en la preparación de las películas. Al comparar los espectros se pudo observar una clara contribución de las bandas asociadas al ácido acético en los espectros de los residuos de CN3-G5 y CN3-G10 (contribución en la región  $3250\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$  y de la banda localizada a  $1711\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual es más evidente en la muestra con mayor contenido de glicerol. Además, también es posible observar una señal a  $1605\text{ cm}^{-1}$  que puede provenir de la contribución del ion acetato. Estos resultados revelan que, además de impurezas presentes en los componentes tales como cadenas hidrocarbonadas y glicerol, al medio simulante se liberan principalmente residuos del ácido acético utilizado en la preparación de las películas, sugiriendo que éste no se elimina completamente durante el proceso de neutralización empleado.

#### 4.3.12- Estudio de los efectos inhibitorios de las películas sobre *E. coli* y *S. flexneri*.

A los efectos de evaluar si las películas nanocompuestas afectan el crecimiento microbiano, se estudió el efecto inhibitorio frente a patógenos intestinales de películas con y sin tratamiento de neutralización durante el proceso de obtención.

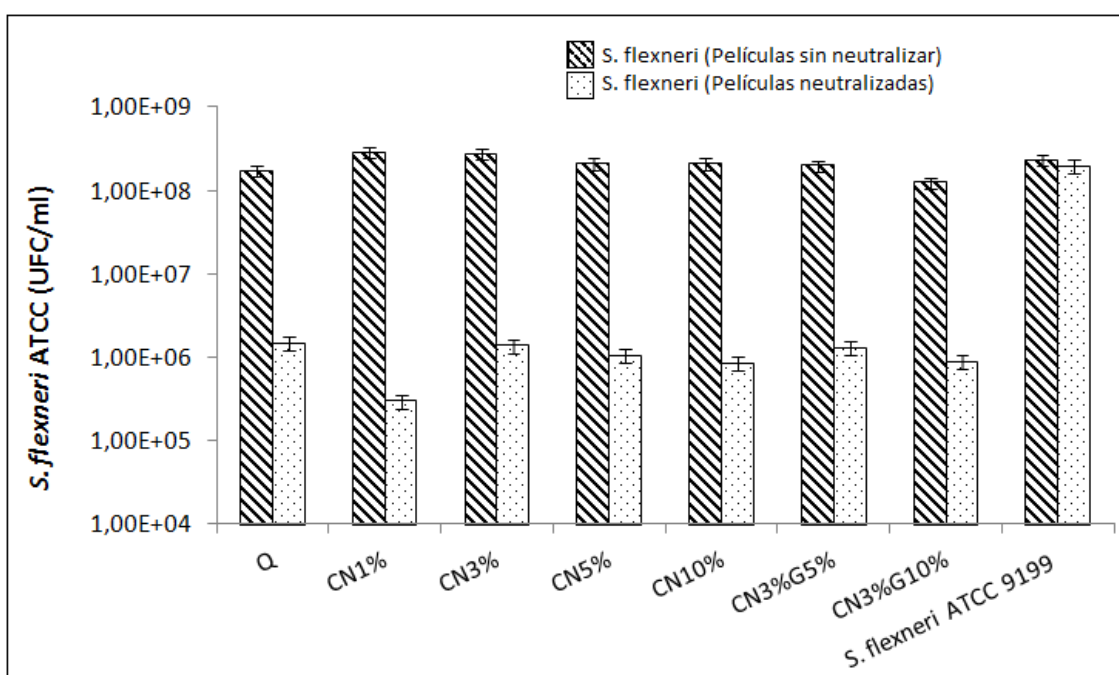
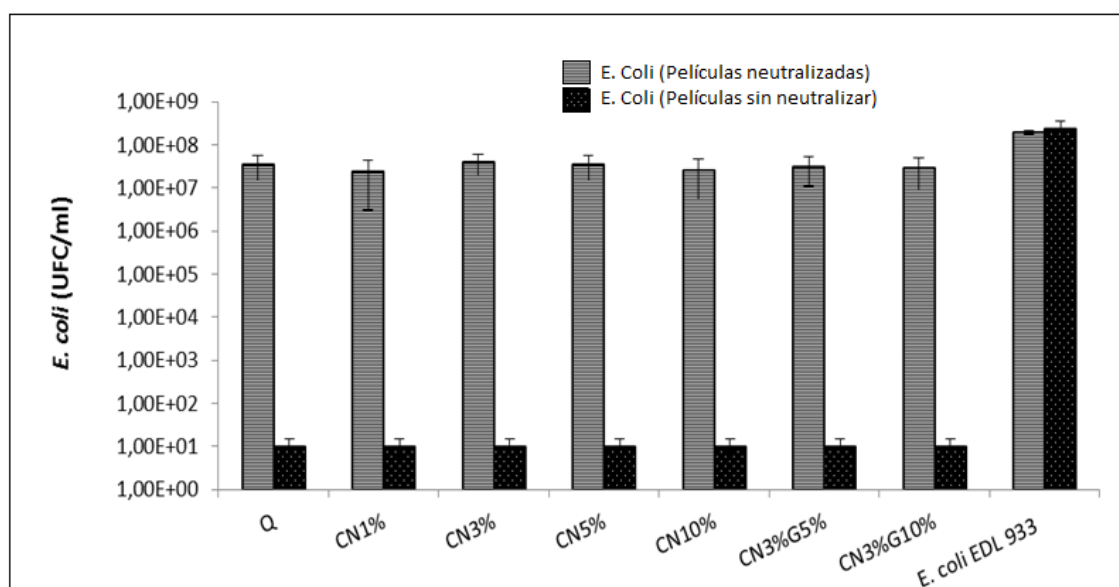
La películas que no fueron neutralizadas presentaron una marcada inhibición (7 log) de *E. coli* como puede observarse en la **Figura 4.23a**, respecto al control de crecimiento. Sin embargo cuando las películas empleadas fueron neutralizadas dicho efecto deja de tener lugar, aunque en



todos los casos se observó una reducción de 1 log. Por otro lado, el efecto frente a *S. flexneri* (**Figura 4.23b**) es claramente diferente, ya que las películas neutralizadas no presentaron un efecto inhibitorio significativo. Por el contrario, las películas que no recibieron el tratamiento de neutralización mostraron un poder inhibitorio siendo la reducción de aproximadamente 3 log, excepto para CN1 que mostró un poder inhibitorio aun mayor (4log). En ambos casos no se observaron efectos relacionados con el contenido de CN y/o G.

Hay varios factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, que afectan a la actividad antimicrobiana del quitosano y los materiales basados en este polímero. Se ha demostrado que el Q de bajo peso molecular (de menos de 10 kDa) tiene mayor actividad antimicrobiana que el Q de alto peso molecular. Además, se requiere un grado de polimerización de al menos siete ya que fracciones de menor peso molecular tienen poca o ninguna actividad antimicrobiana. Quitosanos con alto grado de desacetilación presentan mayor actividad antimicrobiana que aquellos con una mayor proporción de grupos amino acetilados, debido al aumento de la solubilidad y su mayor densidad de carga. Un pH bajo también aumenta la actividad antimicrobiana del Q por los mismos motivos, además de infligir un "efecto barrera" por estrés ácido sobre los organismos objetivo [Dutta y col., 2009]. En general, los ácidos orgánicos, fundamentalmente el ácido láctico y el ácido acético, han sido históricamente empleados como conservantes por ser saludables para el medio ambiente, naturales y generalmente reconocidos como seguros. Se ha propuesto que las moléculas de estos ácidos inhiben el crecimiento de células bacterianas y fúngicas mediante diferentes mecanismos: la disrupción de la membrana plasmática [Bracey y col., 1998], la inhibición de reacciones metabólicas esenciales [Krebs y col., 1983] y el estrés por mantener el pH intracelular [Bracey y col., 1998; Stopforth y col., 2003].

De esta manera, más allá del poder inhibitorio intrínseco que presenta el Q que compone a las películas nanocompuestas preparadas en este trabajo, el poder inhibitorio de las películas sin neutralizar se podría adjudicar al contenido de ácido acético presente en estas muestras (presencia comprobada por los resultados presentados en la sección 4.1), en acuerdo con la información reportada en la bibliografía que demuestran la capacidad inhibitorio de dicho ácido frente a enteropatógenos.



**Figura 4.23-** Efecto inhibitorio frente a enteropatógenos de películas neutralizadas y sin neutralizar preparadas en este trabajo.

**5.**

## **Conclusiones**



## 5- CONCLUSIONES

Las películas de materiales compuestos quitosano-nanocristales de celulosa (Q-CN) y quitosano-nanocristales de celulosa-glicerol (Q-CN-G) obtenidas en este trabajo resultaron ser sistemas de alta transparencia, y sus propiedades dependieron del contenido de nanorefuerzo y plastificante.

El análisis por espectroscopia infrarroja reveló la presencia de una débil interacción entre la matriz polimérica y el nanorefuerzo, la cual no fue modificada por el agregado de plastificante. Por análisis de TGA, estos materiales mostraron una estabilidad térmica levemente superior a la observada para la matriz de quitosano independientemente del contenido de nanorefuerzo, sugiriendo también una leve interacción entre estos dos componentes, la cual se ve afectada por el agregado de plastificante (leve disminución de estabilidad térmica). Las imágenes de SEM sugieren que la incorporación de cantidades mayores al 3 %p/p de nanocristales de celulosa genera sistemas con segregación de fases, mientras que el agregado de glicerol conduce a la homogeneización del material.

Las películas preparadas mostraron tener una superficie más hidrofóbica que el material de referencia en base a los resultados de ángulo de contacto al agua, lo cual puede estar relacionado con un incremento en la rugosidad superficial como se observó por SEM. Por otra parte, la permeabilidad al vapor de agua disminuyó levemente con la incorporación del nanorefuerzo, indicando que éste actúa incrementando la tortuosidad en las películas lo que conduce a procesos de difusión de vapor de agua más lentos. No obstante, las películas preparadas exhibieron mayor absorción de agua -respecto película de quitosano- para las muestras con menor contenido de nanocristales de celulosa (3 %p/p), disminuyendo levemente al aumentar el contenido de este último. Esto indica que el nanorefuerzo, más hidrofílico que la matriz polimérica, favorece el ingreso del agua cuando está presente en bajas concentraciones, aunque posiblemente actúa como barrera física a altas concentraciones limitando así la incorporación de agua.

El agregado de glicerol no indujo cambios significativos en la hidrofiliidad de la superficie ni en la propiedad de absorción de agua de las películas preparadas, aunque los resultados obtenidos sugieren una tendencia a la disminución del ángulo de contacto y un aumento de la absorción de agua de los materiales preparados con este plastificante. En adición, en estas películas la permeabilidad al vapor de agua se incrementó fuertemente lo que se corresponde con la naturaleza hidrofílica y su función plastificante dentro del material, en acuerdo con las tendencias mencionadas anteriormente para el ángulo de contacto y la absorción de agua. La variación de los parámetros obtenidos del estudio de las propiedades mecánicas indican que los nanocristales de celulosa actúan como verdadero refuerzo a bajas concentraciones (hasta un 3

%p/p), donde se observó la disminución de la elongación en el punto de ruptura y el aumento del módulo elástico. Por último, se pudo observar que las películas preparadas en este trabajo presentaron una leve inhibición microbiana frente a *E. coli* y ningún efecto sobre *S. flexneri*.

La modificación de una matriz polimérica de quitosano con nanocristales de celulosa, empleando las materias primas y el procedimiento descrito en este trabajo, condujo a la preparación de un material con potenciales aplicaciones en el campo de los envases alimenticios ecológicos. Un contenido de hasta 3 %p/p de nanorefuerzo y sin agregado de plastificante es adecuado para obtener un material con mejor desempeño en comparación con la matriz polimérica pura (aumento de la hidrofobicidad de la superficie, disminución de la permeabilidad al agua, refuerzo mecánico, resistencia al agua, mejora de la estabilidad térmica), aunque se deben tomar recaudos en la selección de las materias primas y el método de preparación de las películas para evitar la migración de sustancias a un alimento graso frente a una eventual aplicación real de estos materiales como envases.



## **6. Referencias Bibliográficas**



## 6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arrieta M. P., Peponi L., López Martínez J., Kenny J. M. (2015). "Nuevas tendencias en envases alimentarios plásticos". Revista de plásticos modernos: Ciencia y tecnología de polímeros, 109(699): 19-23.
2. ASPO- Association for the Study of Peak & Oil, ([www.peak-oil.org](http://www.peak-oil.org)).
3. ASTM D 638. Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics.
4. Avella M., De Vlieger J. J., Errico M. E., Fischer S., Vacca P., Volpe M. G. (2005). "Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications". Food Chemistry, 93: 467–474.
5. Azeredo Henriette M.C., Luiz Henrique C. Mattoso, Roberto J. Avena-Bustillos, Gino Ceotto Filho, Maximiliano L. Munford, Delilah Wood, Tara H. Mchugh. (2010). "Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content". Journal of Food Science, 75(1).
6. Berghoff C.F. (2011). "Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo". Trabajo de Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata.
7. Bracey D., Holyoak C.D., Coote P.J. (1998). "Comparison of the inhibitory effect of sorbic acid and amphotericin B on *Saccharomyces cerevisiae*: is growth inhibition dependent on reduced intracellular pH?". Journal of Applied Microbiology, 85: 1056.
8. CAA - Código Alimentario Argentino. *Capítulo IV: "Utensilios, recipientes, envases, envolturas, aparatos y accesorios"* (Disponible en [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar)).
9. CAIP - Cámara Argentina de la Industria Plástica ([www.caip.org.ar](http://www.caip.org.ar)).
10. Cao X., Habibi Y., Lucia L.A. (2009). "One-pot polymerization, surface grafting, and processing of waterborne polyurethane - cellulose nanocrystal nanocomposites". Journal of Material Chemistry, 19: 7137–7145.
11. Celebi H., Kurt A. (2015). "Effects of Processing on the properties of chitosan/cellulose nanocrystal films". Carbohydrate Polymers.

12. Dehnad D., Emam-Djomeh Z., Mirzaei H., Jafari S-M., Dadashi S. (2014). "Optimization of physical and mechanical properties for chitosan–nanocellulose biocomposites". *Carbohydrate Polymers*, 105: 222–228.
13. de Menezes A.J., Siqueira G., Curvelo A.A.S., Dufresne A. (2009) "Extrusion and characterization of functionalized cellulose whiskersreinforced polyethylene nanocomposites". *Polymer*, 50: 4552–4563.
14. Dhawade P. P., Jagtap R. N. (2012). "Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry". *Advances in Applied Science Research*, 3(3): 1372-1382.
15. Domínguez-Courtney M. F., Jiménez-Munguía M. T. (2012). "Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones". *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2): 110-121.
16. Dong Y., Ruan Y., Wang H., Zhao Y., Bi D. (2004). "Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques". *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4): 1553–1558.
17. Dufresne A. (2010). "Processing of polymer nanocomposites reinforced with polysaccharide nanocrystals". *Molecules*, 15: 4111-4128.
18. Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J. (2009). "Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications". *Food Chemistry*, 114: 1173–1182.
19. Eichhorn S.J. (2011). "Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications". *Soft Matter*, 7: 303–315.
20. Fabra M. J., López Rubio A., Lagaron J. M. (2014). "Biopolymers for food packaging applications". *Smart Polymers and their applications*.
21. Favier V., Chanzy H., Cavaille J. Y. (1995). "Polymer Nanocomposites Reinforced by Cellulose Whiskers". *Macromolecules*, 28: 6365.
22. Gómez-Ordóñez E., Rupérez P. (2011). "FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds". *Food Hydrocolloids*, 25: 1514.
23. Habibi Y., Lucia L.A., Rojas, O.J. (2010). "Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications". *Chemical Reviews*, 110: 3479–3500.



24. Hong P-Z, Li S-D, Ou C-Y, Li C-P, Yang L, Zhang C-H. (2007). "Thermogravimetric Analysis of Chitosan". *Journal of Applied Polymer Science*, 105: 547–551.
25. Khan A., Khan R.A., Salmieri S, Le Tien C, Riedl B, Bouchard J., Chauve G, Tan V, Kamal M.R., Lacroix M. (2012). "Mechanical and barrier properties of nanocrystalline cellulose reinforced chitosan based nanocomposite films". *Carbohydrate Polymers*, 90: 1601–1608.
26. Koo J.H. (2006). "Polymer nanocomposites. Processing, characterization, and applications". Edt: Kenneth P. McCombs. McGraw-Hill, USA.
27. Krebs H.A., Wiggins D., Stubbs M., Sols A., Bedoya F. (1983). "Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate". *Biochemistry Journal*, 15: 657.
28. Kumar A., Negi Y. S., Choudhary V., Bhardwaj N. K. (2014). "Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste." *Journal of Materials Physics and Chemistry*, 2(1): 1-8.
29. Kurita K., Kaji Y., Mori T., Nishiyama, Y. (2000). "Enzymatic degradation of beta-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation". *Carbohydrate Polymers*, 42: 19-21.
30. Lagaron J. M., Fernandez-Saiz P., Ocio M.J. (2007). "Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7): 2554–2562.
31. Lin N., Dufresne A. (2014). "Surface chemistry, morphological analysis and properties of cellulose nanocrystals with gradiented sulfation degrees". *Nanoscale*, 6: 5384.
32. López O.V. (2012). "Desarrollo, caracterización y aplicación de envases biodegradables a partir de almidón". Trabajo de Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata.
33. López-Suevos F., Eyholzer C., Bordeanu N., Richter K. (2010). "DMA analysis and wood bonding of PVAc latex reinforced with cellulose nanofibrils". *Cellulose*, 17: 387–398.
34. Lu P., Hsieh Y-L. (2010). "Preparation and properties of cellulose nanocrystals: rods, spheres, and network". *Carbohydrate Polymers*, 82: 329–336.

35. Marjadi D., Dharaiya N. (2011). "Bioplastic: A Better Alternative For Sustainable Future". *Search and Research*, 2(2): 2159-163.
36. Peng B.L., Dhar N., Liu H.L., Tam K.C. (2011). "Chemistry and applications of nanocrystalline cellulose and its derivatives: a nanotechnology perspective". *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 9999: 1-16.
37. Pereda M., Moreira M. R., Roura S. L., Marcovich N., Aranguren M. L. (2014). "Bio-películas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos". *Ciencia e investigación*, 64(2): 35.
38. Resolución Grupo Mercado Común (GMC) N° 56/92, referida a "Disposiciones Generales para Envases y Equipamientos Plásticos en contacto con Alimentos", incorporada al Código Alimentario Argentino (CAA, cap. IV).
39. Rhim J-W, Park H-M, Ha C-S. (2013). "Bio-nanocomposites for Food Packaging Applications". *Progress in Polymer Science*, 38: 1629-52.
40. Rinaudo M. (2006). "Chitin and chitosan: Properties and applications". *Progress in Polymer Science*, 31(7): 603-632.
41. Silvestre C., Duraccio D., Cimmino S. (2011). "Food packaging based on polymer Nanomaterials". *Progress in Polymer Science*, 36: 1766-1782.
42. Sorrentino A., Gorrasi G., Vittoria V. (2007). "Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications". *Trends in Food Science & Technology*, 18: 84-95.
43. Stopforth J.D., Lopes M., Shultz J.E., Miksch R.R., Samadpour M. (2006). "Microbiological status of fresh beef cuts". *Journal of Food Protection*, 69: 1456.
44. Wang N., Ding E., Cheng R. (2007). "Thermal degradation behaviors of spherical cellulose nanocrystals with sulfate groups". *Polymer*, 48: 3486-3493.
45. Youssef A.M., Abou-Yousef H, El-Sayed S.M., Kamel S. (2015). "Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films". *International Journal of Biological Macromolecules*, 76: 25–32.
46. Zhang H., Mittal G. (2010). "Biodegradable protein-based films from plant resources: A review". *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 23: 203-220.

Los resultados de este trabajo fueron publicados parcialmente en el "XI Simposio Argentino de Polímeros - SAP 2015" llevado a cabo en Santa Fe, Argentina, del 20 al 23 de octubre de 2015.

Corsello, F.; Peruzzo,P.J.; Amalvy J.I. "Preparación y caracterización de películas de quitosano modificadas con nanocristales de celulosa".